

Identifizierung eines Cathepsin B-vermittelten Todessignalwegs in Thymozyten mit Bedeutung für die negative Selektion

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologin Mareike Becker

aus Quedlinburg

Tag der mündlichen Prüfung:

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation an der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg wurde in der Zeit von März 2004 bis September 2007 unter der Leitung von Prof. Dr. P. H. Krammer in der Abteilung Immungenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt.

Erstgutachter: Herr PD. Dr. Philipp Beckhove
DKFZ Juniorgruppe T-Zell-Tumor-Immunität
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Peter H. Krammer
Immungenetik
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Danksagung

Wissenschaft bestreitet man nie allein! An dieser Stelle möchte ich daher all denen danken, die mir ehrliche Wissenschaft vermittelt und mich bei dieser Arbeit maßgeblich unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter H. Krammer für die interessante und herausfordernde Themenstellung, das Anvertrauen seiner „Thymom-Schatzkiste“ sowie für seine motivierende und unbeirrte Diskussionsfreude bedanken. Die kritische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen in seiner Abteilung hat mich geprägt.

PD Dr. Philipp Beckhove danke ich für die unkomplizierte externe Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Rüdiger Arnold, der für alle Fragen, für gute und schlechte Nachrichten immer ein offenes Ohr hatte. Sein Enthusiasmus und seine engagierte Betreuung haben entscheidend zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen. Dirk, Markus und Christian als großartigen Laborkollegen danke ich herzlich für hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge (auch die nicht-wissenschaftlichen). Am Ende weiß ich, alles wird gut!

Für ihre Hilfe bei Experimenten danke ich Lena und Nicole, außerdem Wolfgang, dessen direkte Art und spezieller pfälzischer Humor ich schätzen gelernt habe.

Dass ich mich im Labor und Schreibraum nicht nur über Wissenschaft unterhalten habe, dafür sei Dirk, Eli, Heiko, Lucie, Julia und ganz besonders Nina gedankt. Danke an alle jetzigen und früheren Mitglieder des Krammer-Labors für die einmalige Arbeitsatmosphäre. In lebhafter Erinnerung werden all die Parties, der tägliche Kaffeeclub, unsere Fußballversuche beim Immunocup und nicht zuletzt die grandiose Weihnachtsfeier bleiben (seither kann ich auf Pfennigabsätzen laufen, „Björn Bond“ hat japanischen Stockkampf, Daniel Bayrisch und Florian den „walczakschen“ Hüftschwung gelernt).

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich Dr. Olga Vasiljeva und Prof. Dr. Christoph Peters. Ein Dankeschön auch an Heidi.

Mein großer Dank gilt Lars!!!

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester für ihre unendliche Unterstützung und die Freiheit, meine Ideen verwirklichen zu können. Worte sind hier nicht genug!

DANKE!

Zusammenfassung

Apoptose, programmierter Zelltod, tritt im Verlauf der normalen Entwicklung und als Reaktion auf verschiedene physiologische oder pathophysiologische Stimuli auf. Im Immunsystem nimmt Apoptose bei der Erhaltung der Zellhomöostase eine zentrale Stellung ein. Im Verlauf der T-Zellentwicklung ist Apoptose ein wichtiger Mechanismus zur Beseitigung von selbstreaktiven T-Zellen im Thymus. Dieser Prozess wird negative Selektion genannt und stellt die Selbsttoleranz der T-Zellpopulation sicher. Fehler bei der Apotoseregulation verursachen eine abnormale Zellentwicklung und fördern die Entstehung von Krebs, Immundefizienzen und Autoimmunerkrankungen.

Molekular ist Apoptose unter anderem durch die Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen, gekennzeichnet. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass der programmierte Zelltod auch ohne die Beteiligung von Caspasen auftritt und andere Proteasen die Exekution des Zelltodes übernehmen können. Da bislang unklar ist, inwieweit die negative Selektion im Thymus unter Beteiligung von Caspasen abläuft, wurde in dieser Arbeit der aktivierungsinduzierte Zelltod in Thymozyten auf dessen Caspaseabhängigkeit hin untersucht. Dazu wurde die thymischen Lymphomzelllinie D als Modell etabliert. Mit Hilfe dieser Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Zelltod nach Stimulation des T-Zellrezeptor (TZR)-Signalweges in Abwesenheit von Caspaseaktivität durch die lysosomale Protease Cathepsin B vermittelt wird. Dieser aktivierungsinduzierte Caspase-unabhängige Zelltod wies charakteristische Kennzeichen der Apoptose auf. Im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes wurden die frühe Permeabilisierung der Lysosomen und die Freisetzung von Cathepsin B ins Zytosol beobachtet. Eine physiologische Relevanz dieses Caspase-unabhängigen Zelltodes wurde in primären murinen Thymozyten gezeigt. Im Vergleich der verschiedenen thymischen T-Zellpopulationen wurde eine deutliche Hochregulation der Cathepsin B-mRNA in doppelt-positiven $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten nachgewiesen. Darüber hinaus war Cathepsin B am TZR-induzierten Zelltod in DP-Thymozyten beteiligt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen einen alternativen, bis dahin unbekannten Todessignalweg in Thymozyten, der möglicherweise eine Bedeutung bei der negativen Selektion im Thymus hat. Diese Arbeit trägt zum molekularen Verständnis der negativen Selektion bei und kann helfen zu verstehen, wie Thymozyten zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden.

Abstract

Apoptosis occurs as part of normal development and in response to a variety of physiological and pathophysiological stimuli. Especially in the immune system, apoptosis plays a central role in cell homeostasis and is an important mechanism for deletion of self-reactive T cells. This process in the thymus is called negative selection and ensures self-tolerance of the T cell repertoire. Deregulation of apoptosis promotes abnormal cell proliferation, development of autoimmune diseases and immune deficiencies as well as tumor growth.

On the molecular level apoptosis is defined by activation of specific proteases, the caspases. However, recent findings of caspase-independent programmed cell death mechanisms have opened new perspectives on the biology of cell demise and suggested that other proteases are also pivotally involved.

The caspase-dependency of negative selection is controversially discussed. Therefore this work focuses on the identification of caspase-independent cell death mechanisms in thymocytes. For this purpose the thymic lymphoma cell line D was used as a model for cell death of thymocytes. The data presented here show that activation-induced cell death in this cell line can use a caspase-independent pathway which is mediated by the lysosomal protease cathepsin B. This caspase-independent cell death shows hallmarks of apoptosis. Lysosomal membrane permeabilisation is observed early after stimulation and is accompanied by the release of cathepsin B into the cytosol. Furthermore, primary murine double-positive CD4⁺CD8⁺-thymocytes show the highest expression of cathepsin B mRNA compared to the other thymocytes subsets. Importantly, DP thymocytes die partially in a cathepsin B-dependent fashion after T cell receptor (TCR) stimulation.

Thus, this work identifies a new cell death pathway in thymocytes which might have an essential functional relevance in negative thymic selection. This knowledge contributes to the molecular understanding of negative selection.

DANKSAGUNG.....	1
ZUSAMMENFASSUNG.....	II
ABSTRACT	III
1 EINLEITUNG	8
1.1 Apoptose – Der programmierte Zelltod	8
1.1.1 Der extrinsische Signalweg	9
1.1.2 Der intrinsische Signalweg	12
1.1.3 Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose	14
1.1.4 Die Caspasen	17
1.2 Apoptose im Immunsystem.....	19
1.2.1 Die T-Zellentwicklung	19
1.2.2 Die negative Selektion	22
1.2.3 Apoptose in peripheren T-Zellen	26
1.3 Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod	28
1.3.1 Die Rolle der Lysosomen während des programmierten Zelltodes	31
1.3.2 Die Cathepsine	33
1.4 Ziel der Arbeit	37
2 MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 Material.....	38
2.1.1 Chemikalien	38
2.1.2 Häufig verwendete Puffer	38
2.1.3 Biologisches Material	41
2.1.3.1 Bakterienstämme	41
2.1.3.2 Eukaryontische Zellen	41
2.1.3.3 Mäuse	42
2.1.4 Nährmedien	42
2.1.4.1 Medien für die Zellkultur	42
2.1.4.2 Medien für Bakterien	43
2.1.5 Antikörper	43
2.1.6 Apoptosestimuli, Inhibitoren und Proteasesubstrate	45
2.1.7 Molekularbiologische Materialien	46

2.1.7.1 Synthetische Oligonukleotide	46
2.1.7.2 Enzyme und Kits.....	47
2.1.8 Geräte	48
2.1.9 Software	50
2.2 Methoden	50
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	50
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	50
2.2.1.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren ..	52
2.2.1.4 Transformation von Bakterien	52
2.2.1.5 Isolierung von RNA.....	53
2.2.1.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	54
2.2.1.7 Quantitative Sybr Green PCR	54
2.2.1.8 RNA-Oligo-basierende RNA-Interferenz	55
2.2.2 Proteinchemische Methoden.....	55
2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.2.2 Western Blot.....	56
2.2.2.3 Lyse von eukaryontischen Zellen	57
2.2.2.4 Immunpräzipitation	57
2.2.2.5 Aufreinigung monoklonaler Antikörper	57
2.2.2.6 Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode	58
2.2.2.7 Bestimmung der Enzymaktivität von Caspasen	58
2.2.3 Zellbiologische Methoden	59
2.2.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	59
2.2.3.2 Zellzahlbestimmung.....	59
2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....	60
2.2.3.4 Präparation primärer muriner Thymozyten.....	60
2.2.3.5 Transfektion von Zellen	61
2.2.3.6 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen (Durchflusszytometer)	61
2.2.3.7 Stimulation von Zellen	62
2.2.3.8 Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderungen ..	62
2.2.3.9 Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti.....	63
2.2.3.10 Nachweis von DNA-Fragmentierung als „DNA-Leiter“	63
2.2.3.11 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials.....	64
2.2.3.12 Messung von ROS	65
2.2.3.13 Ca ²⁺ -Messung im Durchflusszytometer.....	65
2.2.3.14 Immunfluoreszenz.....	66
2.2.3.15 <i>In vitro</i> anti-CD3 Stimulation	66
2.2.3.16 Acridinorange-Färbung von Lysosomen	67
2.2.3.17 Zellsortierung von Thymozyten–Subpopulationen	67

3 ERGEBNISSE 69

3.1	Die Lymphomzelllinie D exprimiert T-Zelloberflächenmoleküle und stirbt nach Stimulation des TZR-Signalweges	69
3.2	Der aktivierungsinduzierte Zelltod der thymischen Lymphomzelllinie D ist unabhängig von den Todesrezeptoren CD95, TRAIL-R2 und TNF-R1 .	73
3.3	Im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes der thymischen Lymphomzelllinie D werden Caspasen prozessiert und aktiviert	75
3.4	Der aktivierungsinduzierte Zelltod der Zelllinie D kann nicht durch Caspaseinhibition verhindert werden	76
3.5	Der Caspase-unabhängige Zelltod nach PMA/Ionomyzin-Stimulation zeigt apoptotische Merkmale	78
3.6	Die lysosomale Protease Cathepsin B vermittelt den Caspase-unabhängigen Zelltod in der Zelllinie D	80
3.7	PMA/Ionomyzin-Stimulation bewirkt LMP und eine veränderte zelluläre Lokalisation von Cathepsin B	83
3.8	Die Generierung von ROS ist nicht verantwortlich für den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D	87
3.9	Die mRNA-Synthese von Cathepsin B ist während der T-Zellentwicklung differentiell reguliert	89
3.10	DP-Thymozyten sterben nach TZR-Stimulation partiell Cathepsin B-abhängig	90

4 DISKUSSION 94

4.1	Die thymische Lymphomzelllinie D ermöglicht die Untersuchung des Zelltodes von Thymozyten <i>in vitro</i>	95
4.2	Caspase-Inhibition verhindert nicht aktivierungsinduzierten Zelltod in der der thymischen Lymphomzelllinie D	97
4.2.1	Der aktivierungsinduzierte Zelltod zeigt einen apoptotischen Phänotyp	98
4.2.2	Cathepsin B ist ein Schlüsselmolekül beim Caspase-unabhängigen Zelltod	99
4.2.3	LMP und die Umverteilung von Cathepsin B in der Zelle sind frühe Vorgänge beim aktivierungsinduzierten Zelltod	101
4.2.4	Die Entstehung von ROS ist nicht verantwortlich für den aktivierungsinduzierten Zelltod	102
4.3	Primäre murine DP-Thymozyten sterben nach TZR-Stimulation partiell Cathepsin B und/oder L-abhängig	103
4.3.1	Die mRNA-Synthese von Cathepsin B wird während der T-Zellentwicklung differentiell reguliert	104
4.3.2	DP-Thymozyten sterben <i>ex vivo</i> partiell Cathepsin B-abhängig	105

4.4	Ausblick und Modell	107
5	LITERATURVERZEICHNIS	111
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	129
7	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	133
8	ERKLÄRUNG.....	134

1 Einleitung

1.1 Apoptose – Der programmierte Zelltod

Die Existenz mehrzelliger Organismen ist ohne Tod nicht denkbar. Im Organismus herrscht auf zellulärer Ebene ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod, welches Entwicklung, Wachstum und Differenzierung ermöglicht. Somit spielt der Zelltod eine bedeutende Rolle bei der Ontogenese und der Gewebekomöostase mehrzelliger Organismen (Los et al., 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999). Galenus Galen beschrieb schon im zweiten Jahrhundert n. Chr. die Regression larvaler und fötaler Strukturen im Verlauf der Ontogenese (Barclay et al., 1944; Clarke und Clarke, 1996) und bereits 1842 erkannte Carl Vogt, dass Zellen einen „programmierten“ Zelltod sterben können (Vogt, 1842). Anknüpfend an Untersuchungen des Embryologen Glücksmann über sterbende Embryonalzellen (Glücksmann, 1965) formulierten Kerr, Wyllie und Currie erstmals das Konzept eines „programmierten“ Zelltodes und prägten hierfür den Begriff Apoptose (griech.: das Herabfallen) (Kerr et al., 1972).

Die Apoptose ist ein streng regulierter zellulärer Prozess, in dessen Verlauf katabolische Enzyme wie Proteasen und Nukleasen aktiviert werden. Ein Kennzeichen der Apoptose sind morphologische Veränderungen: Die Zelle schrumpft, und das Chromatin kondensiert in der Peripherie des Zellkerns. Bei den meisten Formen der Apoptose wird die Desoxyribonukleinsäure (engl.: *desoxyribonucleic acid*, DNA) in den kondensierten Chromosomen durch spezielle Endonukleasen abgebaut. Diese DNA-Degradierung stellt sich nach einer Elektrophorese als charakteristische „DNA-Leiter“ dar (Wyllie et al., 1980), die durch internukleosomale Spaltung der DNA in ca. 200 Basenpaar (bp)-lange DNA-Fragmente bzw. ganzzahlige Vielfache davon entsteht. Eine frühe morphologische Veränderung der Zelle ist die Ausstülpung der Zellmembran (Zeiose), die durch den Verlust der Membranstabilität ausgelöst wird. In Folge dessen werden membranumschlossene Teile der Zelle abgeschnürt, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Parallel dazu verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie, was sich als Exposition von Lipiden des inneren Membranblattes, wie zum Beispiel Phosphatidylserin

(PS), auf der Zelloberfläche darstellt. Die apoptotischen Körperchen werden innerhalb weniger Stunden von phagozytierenden Zellen erkannt, aufgenommen und abgebaut, so dass eine Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile durch den fortschreitenden Zerfall der sterbenden Zelle verhindert wird. Dadurch werden keine Entzündungsreaktionen hervorgerufen (Savill et al., 1993). Im Gegensatz dazu steht der als Nekrose bezeichnete unregulierte Zelltod, der von einer entzündlichen Immunantwort und der Zerstörung des Gewebes begleitet wird (Kerr et al., 1972; Okada und Mak, 2004). Obwohl sich Apoptose und Nekrose in ihrem Ablauf voneinander unterscheiden, gibt es Hinweise darauf, dass beide Prozesse miteinander verknüpft sein können. So kann die Blockade der apoptotischen Signalkaskade in bestimmten Fällen zum nekrotischen Zelltod führen (Vercammen et al., 1998).

Apoptose kann über zwei grundlegend unterschiedliche Wege ausgelöst werden, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg.

1.1.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren initiiert, indem diese ihre extrazellulären Liganden binden (Bhardwaj und Aggarwal, 2003; Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001; Peter et al., 1998). Diese rezeptorvermittelte Induktion von Apoptose ist für die Entwicklung, Differenzierung und Homöostase des Immunsystems von entscheidender Bedeutung und bildet eine Grundlage für die Effektorfunktion zytotoxischer Lymphozyten (Krammer, 2000; Krammer et al., 1994).

Mit der Entdeckung des CD-Proteins (engl.: *cluster of differentiation*) CD95 (APO-1/Fas) wurde erstmals ein Apoptose-induzierendes Oberflächenmolekül beschrieben (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989). CD95 ist ein differentiell glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 42-52 kDa und wird in den meisten Säugetiergeweben exprimiert (Leithauser et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992b). Es gehört zur TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie (engl.: *tumor necrosis factor*, TNF; *nerve growth factor*, NGF), deren Mitglieder eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie Differenzierung, Aktivierung, Proliferation und Apoptose von Zellen steuern (Locksley et al., 2001). Eine Unterfamilie

bilden die Todesrezeptoren, welche Apoptose auslösen (Bhardwaj und Aggarwal, 2003; Bodmer et al., 2002; Peter et al., 1998). Derzeit sind sechs Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2) und DR6 (Ashkenazi und Dixit, 1999; French und Tschopp, 2003; Schulze-Osthoff et al., 1998; Zola et al., 2005). Die Todesrezeptoren besitzen zwei bis vier extrazelluläre, cysteinreiche Motive und eine intrazelluläre, ungefähr 80 Aminosäuren lange Todesdomäne (engl.: *death domain*, DD), welche für die stimulationsabhängige Induktion der Apoptose essentiell ist (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Darüber hinaus wurden bis heute vier Scheinrezeptoren (engl.: *decoy receptors*, DcR) gefunden: DcR3, TRAIL-R3 (DcR1/CD263), TRAIL-R4 (DcR2/CD264) und Osteoprotegrin (OPG). Sie induzieren keine Apoptose und verhindern die Aktivierung der Todesrezeptoren, indem sie die Liganden kompetitiv binden (Sheridan et al., 1997). Die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgt durch Bindung eines spezifischen extrazellulären Liganden. *In vitro* können CD95 und TNF-R1 auch durch agonistische Antikörper stimuliert werden (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989).

Wie die Todesrezeptoren gehören auch deren Liganden, mit Ausnahme von NGF, zur TNF-Familie. Die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der TNF/NGF-Rezeptorfamilie und ihren Liganden sind teilweise redundant. Der CD95 Ligand (CD95L, CD178/APO-1L, FasL) ist ein glykosyliertes Typ-II-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kDa (Suda et al., 1993; Takahashi et al., 1994b; Yu et al., 1999). Anders als CD95, das ubiquitär exprimiert wird, ist die CD95L-Expression auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sowie auf einige immunprivilegierte, nicht-lymphoide Organe wie die vordere Augenkammer (Griffith et al., 1995) und die Hoden (Yu et al., 1999) beschränkt. Des Weiteren wurde die Expression von CD95L in verschiedenen neoplastischen Zellen gezeigt (Hahne et al., 1996; Strand et al., 1996). Neben der membranständigen ist auch eine lösliche Form von CD95L beschrieben, die von einer Metalloprotease durch Spaltung generiert wird (Kayagaki et al., 1995; Mariani et al., 1995; Tanaka et al., 1998).

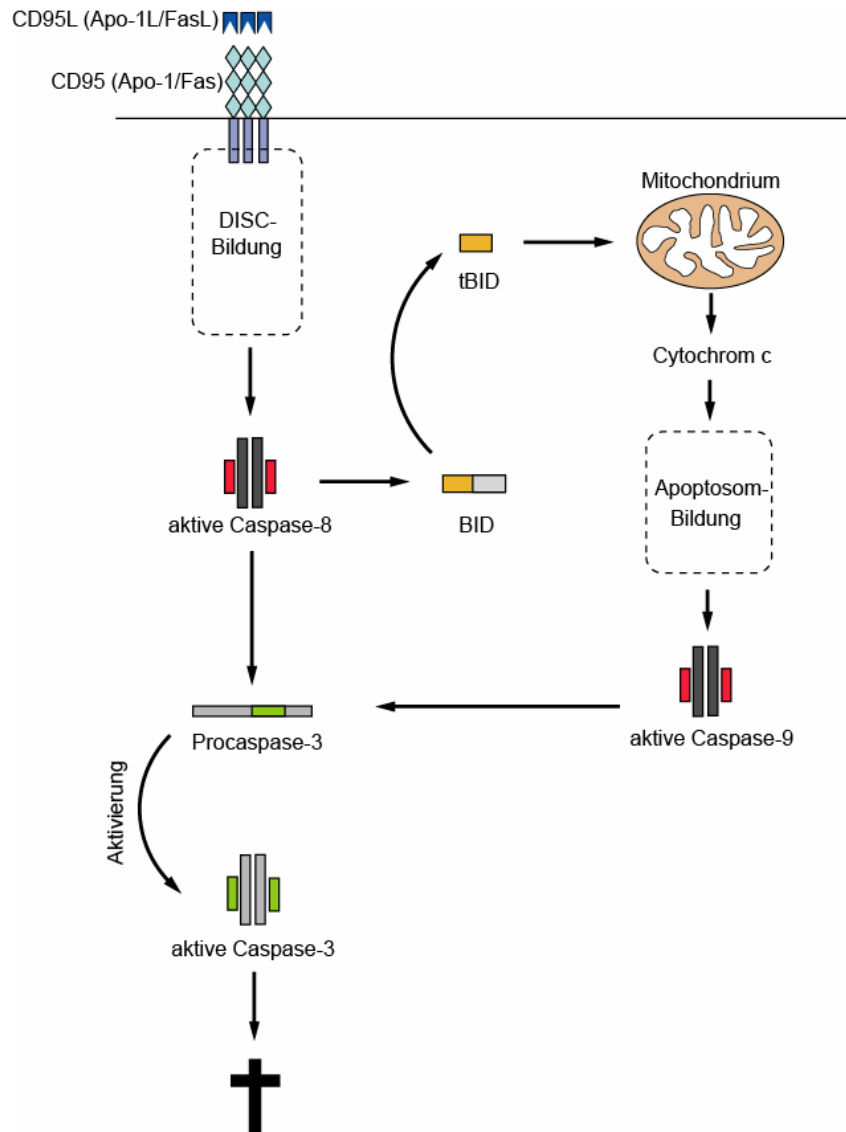


Abbildung 1.1: Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren initiiert

Eine schematische Darstellung der molekularen Prozesse im Verlauf der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist exemplarisch für den Todesrezeptor CD95 gezeigt. Einzelheiten siehe 1.1.1.

Die Stimulation von CD95 führt innerhalb von Sekunden zur Ausbildung eines hochmolekularen Multiproteinkomplexes, des Tod-induzierenden Signalkomplexes (engl.: *death-inducing signaling complex*, DISC). Der CD95-DISC setzt sich zusammen aus oligomerisierten (wahrscheinlich trimerisierten) CD95-Molekülen, dem Adaptermolekül FADD (engl.: *Fas-associated death domain-containing protein*) und den beiden

Splicevarianten Procaspase-8a und Procaspase-8b (siehe Abbildung 1.1). Zusätzlich kann der CD95-DISC Procaspase-10 und das zelluläre FLIP-Protein (engl.: *cellular FLICE inhibitory protein*, c-FLIP) enthalten. In diesem Multiproteinkomplex werden die assoziierten Caspasen autoproteolytisch aktiviert und lösen im Zytosol eine Caspasekaskade aus, die zur Spaltung zellulärer Substrate führt und somit den Tod der Zelle einleitet (Krammer, 2000; Medema et al., 1997; Muzio et al., 1998; Peter und Krammer, 2003; Yang et al., 1998).

Bei der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose können die Mitochondrien zur Verstärkung des apoptotischen Signals dienen (siehe 1.1.2 und Abbildung 1.1). Dies geschieht durch eine Caspase-8-vermittelte Spaltung des pro-apoptotischen Mitglieds der Bcl-2-Familie (engl.: *B-cell lymphoma 2*) Bid (engl.: *BH3 interacting domain death agonist*), die zur Bildung des 15 kDa großen Spaltproduktes tBid führt. Dieses Spaltprodukt transloziert an die Mitochondrien und löst die Aggregation der pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak aus (siehe 1.1.2). Die Folge ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c (Gross et al., 1999b; Korsmeyer et al., 2000; Luo et al., 1998). Dieser Prozess löst letztendlich die Aktivierung von Caspase-9 aus und initiiert somit eine Caspasekaskade.

1.1.2 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch intra- oder extrazelluläre Stimuli, wie zum Beispiel oxidativen Stress, mutagene Strahlung, DNA-Schäden oder Entzug von Zytokinen aktiviert (Erlacher et al., 2005; Takahashi et al., 2004). Ein zentraler Regulator des intrinsischen Signalweges ist das Mitochondrium (siehe Abbildung 1.2). Die Aktivierung des intrinsischen Signalweges führt über eine Permeabilisierung der Mitochondrien und der darauf folgenden Aktivierung von Caspasen zum Tod der Zelle (Ferri und Kroemer, 2001; Kroemer et al., 2007).

Die Permeabilisierung der Mitochondrien wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Die Bcl-2-Familienmitglieder sind somit Schlüsselmoleküle im Verlauf des intrinsischen Signalweges. Der Namensgeber dieser Proteinfamilie ist das Onkogen *bcl-2*, das in Folge einer chromosomalen Translokation von vielen B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird (Tsujimoto et al., 1985). Die Überexpression von Bcl-2 schützt diese

Zellen vor Apoptose (Hockenbery et al., 1990; Vaux et al., 1988). Die Bcl-2-Proteinfamilie umfasst pro-apoptotische (Bak, Bax, Bok/MTD, Bcl-x_s, Bad, Bid, Bik/NBK, Hrk/DP5, Bim/bod, NIP3, Nix, NOXA, PUMA, Bmf) und anti-apoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2A1/Bfl-1, BOO/DIVA, NR-13) (Gross et al., 1999a; Strasser, 2005; Vander Heiden et al., 1997). Gemeinsames Kennzeichen aller Bcl-2-Familienmitglieder ist das Bcl-2-Homologiemotiv (engl.: *Bcl-2 homology*, BH), das für die Proteinstruktur und die Funktion wichtig ist (Gross et al., 1999a). Alle bisher bekannten anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine besitzen vier BH-Motive (BH1-BH4). Die Bedeutung der anti-apoptotischen Proteine wird in Deletionsexperimenten mit Mäusen deutlich. So sind Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bcl-2A1 und Mcl-1 für das Überleben verschiedener Zelltypen notwendig, wie zum Beispiel reifer B- und T-Zellen und erythroider Vorläuferzellen (Motoyama et al., 1995; Nakayama et al., 1993; Opferman et al., 2003; Print et al., 1998; Veis et al., 1993b; Xiang et al., 2001).

Die pro-apoptotischen Mitglieder unterteilen sich in Proteine, denen ein oder mehrere BH-Motive fehlen (wie Bax, Bak und Bok) und solche Proteine, die nur über das dritte BH-Motiv verfügen (engl.: *BH3-only-Proteine*) wie Bid, Bim, Bik/NBK, Hrk/DP-5, Bmf, NOXA und PUMA. Bax und Bak sind für den intrinsischen Signalweg unerlässlich, da Zellen, in denen sowohl Bax als auch Bak deletiert wurde, resistent gegen verschiedene Apoptose-auslösende Stimuli sind (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001). Die *BH3-only-Proteine* wirken als Sensoren für apoptotische Stimuli und stehen in der Signalleitung oberhalb der Bax/Bak-ähnlichen Proteine (Chao und Korsmeyer, 1998; Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001). Sie aktivieren den mitochondrialen Signalweg zum einen durch die Inaktivierung anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie Bcl-2 und Bcl-x_L und zum anderen durch die Aktivierung pro-apoptotischer Proteine wie Bax und Bak (siehe Abbildung 1.2). Die Regulation der pro-apoptotischen Aktivität der *BH3-only-Proteine* ist komplex und kann auf Transkriptionsebene oder durch posttranslationale Proteinmodifikationen erfolgen. Die Transkription von NOXA (engl.: *NADPH oxidase activator*) und PUMA (engl.: *p53-up-regulated modulator of apoptosis*) kann zum Beispiel nach DNA-Schädigung durch den Tumorsuppressor p53 induziert werden (Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000). Posttranslationale Proteinmodifikationen sind für das *BH3-only-Protein* Bim (engl.: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*) gezeigt, dessen Aktivität und Stabilität von seinem Phosphorylierungsstatus abhängt (Lei und Davis, 2003; Ley et al., 2003). Sowohl anti- als auch pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder sind für eine normale Entwicklung

und die zelluläre Homöostase im Immunsystem und anderen Geweben unerlässlich. Das Verhältnis von anti-apoptotischen zu pro-apoptotischen Proteinen ist dabei ausschlaggebend für die Apoptosesensitivität einer Zelle.

1.1.3 Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose

Die Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Apoptose, da viele Apoptosestimuli direkt oder indirekt auf sie einwirken (Kroemer et al., 2007). Das mitochondriale Transmembranpotential sinkt im Verlauf der Apoptose ab, noch bevor die DNA kondensiert und anschließend fragmentiert wird (Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1995). Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (engl.: *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) definiert den Punkt der unumkehrbaren Apoptoseinduktion (Perfettini et al., 2005). Der genaue Mechanismus von MOMP ist noch unklar, jedoch spielen Bcl-2-Proteine eine entscheidende Rolle. Ein Modell geht von einer Porenbildung in der äußeren mitochondrialen Membran durch die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak aus. Basierend auf diesem Modell können Bax und Bak durch die *BH3-only*-Proteine Bid und Bim aktiviert werden. Infolgedessen translokieren Bax und Bak an die Mitochondrien, oligomerisieren zu einem hochmolekularen Komplex und integrieren in die äußere Mitochondrienmembran, was die Auslösung von MOMP zur Folge hat (Cory und Adams, 2002; Danial und Korsmeyer, 2004; Strasser et al., 2000). Ein anderes Modell postuliert eine Permeabilitätstransition (PT). Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch das Öffnen von Poren in der inneren Mitochondrienmembran (Bernardi et al., 1998). Die Poren erlauben einen Durchtritt von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1,5 kDa. Die Zusammensetzung der PT-Poren ist nicht vollständig bekannt, jedoch sind Cyclophilin D, der Adeninnukleotid-Translokator ANT sowie der spannungsabhängige Anionenkanal VDAC (engl.: *voltage-dependent anion channel*) als Bestandteile der PT-Poren beschrieben worden. Die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak können das Öffnen der PT-Poren begünstigen (Green und Kroemer, 2004; Kroemer et al., 2007; Marzo et al., 1998a; Marzo et al., 1998b), während die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine die Bildung der PT-Poren verhindern (Kroemer et al., 1997; Petit et al., 1996; Yang et al., 1997). Das Öffnen der PT-Poren führt zu einem Ausstrom von Cytochrom c und nachfolgender

Apoptose, während die pharmakologische Inhibition der PT-Porenöffnung den Cytochrom c-Ausstrom verhindert und auf diese Weise Apoptose blockiert (Loeffler und Kroemer, 2000). Ein neueres Modell geht davon aus, dass das Öffnen von Kanälen in der inneren Mitochondrienmembran durch reaktive Sauerstoffradikale (engl.: *reactive oxygen species*, ROS) oder durch den Einstrom von Kalzium-Ionen verursacht wird (Green, 2005; Henry-Mowatt et al., 2004; Marzo et al., 1998b). Als Quelle reaktiver Sauerstoffradikale werden die Mitochondrien diskutiert, die bei der Inhibition des Elektronentransfers innerhalb der Atmungskette Superoxid-Radikale freisetzen (Cai und Jones, 1998; Newmeyer und Ferguson-Miller, 2003). Gleichzeitig sind die Mitochondrien Zielorganellen für die schädigenden Effekte von ROS (Ott et al., 2007). So können beispielsweise mitochondriale Lipide durch Peroxidation geschädigt werden und so den Metabolismus der Mitochondrien beeinflussen.

Der Ausstrom von Cytochrom c ins Zytosol ist ein nahezu universelles Charakteristikum der mitochondrialen Apoptoseinduktion und trägt zur Caspaseaktivierung bei (siehe Abbildung 1.2). Freigesetztes Cytochrom c bindet an das Adaptormolekül Apaf-1 (engl.: *apoptotic protease activating factor-1*). Dadurch wird eine Konformationsänderung von Apaf-1 verursacht und die Bindung von Procaspase-9 ermöglicht. Die Assoziation von Procaspase-9 mit Apaf-1 wird über die in beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Rekrutierungsdomänen (engl.: *caspase recruitment domain*, CARD) unter Verbrauch von ATP vermittelt (Li et al., 1997; Qin et al., 1999). Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase-9 wird Apoptosom genannt und besitzt eine Masse von 700 kDa bis 1,4 MDa (Cain et al., 2000; Zou et al., 1999). Die Bindung von Procaspase-9 an Apaf-1 bewirkt die autokatalytische Aktivierung von Caspase-9 (Srinivasula et al., 1998) und führt zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3. Neuere Studien zeigen, dass Apaf-1 auch über einen Apoptosom-unabhängigen Mechanismus Apoptose induzieren kann (Hao et al., 2005).

Neben Cytochrom c werden weitere pro-apoptotische Faktoren aus den Mitochondrien apoptotischer Zellen ins Zytosol entlassen (van Loo et al., 2002a). Zu diesen Faktoren gehören AIF (engl.: *apoptosis-inducing factor*) und die Endonuklease G (EndoG), die in den Kern translozieren und dort die Kondensation und die Spaltung der DNA in 50 kb große Fragmente induzieren (Cheung et al., 2006; Li et al., 2001; Parrish et al., 2001; Susin et al., 1999; Susin et al., 1997). Die pro-apoptotische Funktion von AIF wird jedoch kontrovers diskutiert. Zusätzlich werden aus dem mitochondrialen Intermembranraum die Serinprotease HtrA2/Omi (engl.: *high temperature requirement protein A2*) sowie

SMAC/DIABLO (engl.: *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*) freigesetzt. Sowohl HtrA2/Omi als auch SMAC/DIABLO binden an endogene Caspaseinhibitoren, die zur IAP-Familie (engl.: *inhibitor of apoptosis protein*) gehören (siehe 2.3), und neutralisieren so deren anti-apoptotische Aktivität (Chai et al., 2000; Du et al., 2000; Gao et al., 2007; Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2001; van Loo et al., 2002b; Verhagen et al., 2000; Wu et al., 2000).

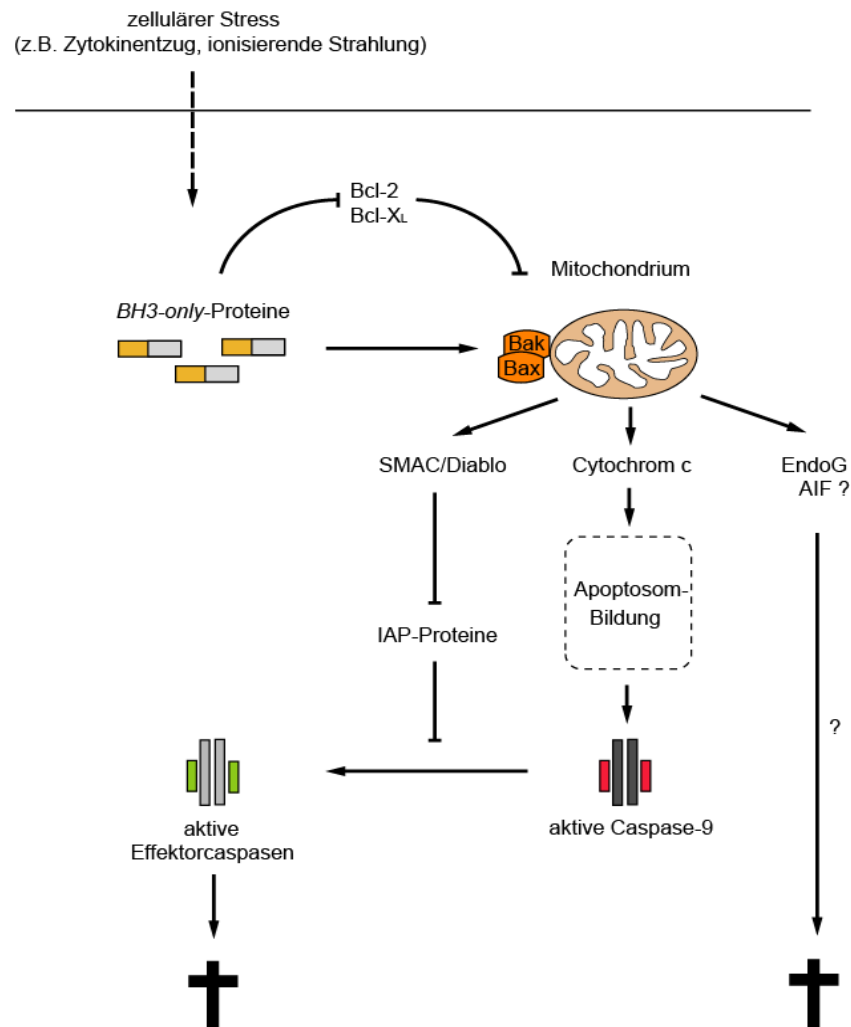


Abbildung 1.2: MOMP ist ein zentraler Vorgang beim intrinsischen Signalweg der Apoptose

Eine schematische Darstellung der molekularen Prozesse während des intrinsischen Signalwegs der Apoptose. Das Fragezeichen macht noch ungeklärte Signalwege deutlich. Einzelheiten siehe 1.1.2 und 1.1.3.

1.1.4 Die Caspasen

Die meisten der morphologischen Veränderungen während der Apoptose werden durch zytosolische Proteasen ausgelöst, die gezielt in apoptotischen Zellen aktiviert werden. Sie gehören zur Proteinfamilie der Caspasen (engl.: *cysteine aspartate-specific proteases*). Caspasen sind Schlüsselmoleküle bei der Apoptose, da sie zelluläre Substrate spalten.

Caspasen weisen ein Cystein im aktiven Zentrum auf und spalten ihre Substrate nach einer spezifischen Sequenz von vier Aminosäuren hinter einem Aspartat (Alnemri et al., 1996; Earnshaw et al., 1999; Thornberry und Lazebnik, 1998). Alle Caspasen werden in der Zelle als katalytisch inaktive Proenzyme synthetisiert und besitzen eine aminoternale Prodomäne sowie eine große und eine kleine Untereinheit. Erst durch Proteolyse und Heterotetramerisierung werden Caspasen zu funktionsfähigen Enzymen. Durch die proteolytische Spaltung werden die große und die kleine Untereinheit freigesetzt. Diese Aktivierung kann durch andere aktive Caspasen oder autokatalytisch erfolgen. Die freigesetzte große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum. Analysen der Kristallstrukturen von Caspase-1, -3 und -8 zeigen, dass das aktive Enzym aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten in Form eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut ist (Blanchard et al., 1999; Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994; Watt et al., 1999; Wilson et al., 1994).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 14 Caspasen in Säugetieren beschrieben worden, die unterschiedliche Funktionen vor allem bei der Initiation und Exekution der Apoptose erfüllen. Ihrer Aufgabe entsprechend, werden sie in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt. Zu den Initiatorcaspasen zählen Procaspase-8, -9 und -10. Ihre Aktivierung erfolgt über regulatorische Protein-Protein-Interaktionen in großen Proteinkomplexen, die als Initiationskomplexe bezeichnet werden (Hengartner, 2000). Die Rekrutierung der Caspasen in den Initiationskomplex erfolgt über bestimmte Strukturmodule, welche das DD-Motiv, die Todeseffektordomäne (engl.: *death effector domain*, DED) und das CARD-Motiv umfassen. Die Interaktion dieser Domänen bringt die inaktiven Procaspasen in räumliche Nähe und ermöglicht eine Dimerisierung und damit eine Aktivierung der Enzyme. Die aktiven Initiatorcaspasen übermitteln frühe apoptotische Signale, indem sie die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 spalten und diese dadurch

aktivieren. Die Effektorcaspasen spalten an der Apoptose beteiligte Proteine sowie weitere zytosolische und nukleäre Substrate.

Eine Vielzahl verschiedener apoptotischer Stimuli aktiviert Caspasen (Krammer, 1999) und löst somit eine Caspasekaskade aus, die zur Degradierung wichtiger zellulärer Proteine führt. Es wurde gezeigt, dass etwa 400 Proteine nach der Induktion von Apoptose proteolytisch degradiert werden (Lüthi und Martin, 2007), welche die charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen auslösen (Earnshaw et al., 1999; Slee et al., 1999). Die Spaltung von nukleären Laminen ruft die Kondensation des Chromatins hervor, während die Spaltung weiterer Strukturproteine, zu denen Aktin, Gelsolin, Cytokeratin 18, Plektrin und Fodrin gehören, zur Ausstülpung der Zelle sowie zur Abschnürung apoptotischer Körperchen führt (Harris und Morrow, 1990; Thornberry und Lazebnik, 1998). Auch Moleküle der verschiedenen Signalwege, wie zum Beispiel Rb, STAT-1, PAK2, PKC, PP2A, Bid und MEKK-1 (siehe Abkürzungsverzeichnis) (Nicholson, 1999; Stegh et al., 2000) und regulatorische Proteine wie ICAD (Inhibitor von CAD) und Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP-1) werden gespalten (Lazebnik et al., 1994; Sakahira et al., 1998). So führt die Degradierung von ICAD zur Freisetzung der Endonuklease CAD (engl.: *caspase-activated DNase*), die in den Nukleus transloziert und dort die genomische DNA spaltet.

Caspasen werden einerseits transkriptionell und über posttranslationale Modifikationen reguliert (Earnshaw et al., 1999). Andererseits erfolgt ihre Regulation über Caspaseinhibitoren der IAP-Familie (engl.: *inhibitor of apoptosis protein*). Die Mitglieder der IAP-Familie wurden initial als Bakulovirus-kodierte Proteine beschrieben, die Apoptose in infizierten Wirtszellen unterdrücken (Clem et al., 1991). Die zellulären Homologe der IAP-Familie zeichnen sich durch ein oder mehrere BIR-Motive (engl.: *baculovirus IAP repeat*) aus, über die sie direkt oder indirekt die enzymatische Aktivität der Caspasen inhibieren. In Säugetieren sind acht IAP beschrieben, dazu gehören XIAP (engl.: *X-linked IAP*), c-IAP1 (engl.: *cellular IAP*), c-IAP2, ML-IAP (engl.: *melanoma IAP*) und Survivin. Caspase-9 wird hauptsächlich durch XIAP inhibiert, Caspase-3 und -7 zusätzlich durch c-IAP1 und c-IAP2 (Salvesen und Duckett, 2002). Verschiedene IAP-Proteine sind in Tumoren überexprimiert, so zum Beispiel Survivin (Ambrosini et al., 1997).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Caspasen nicht nur während der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, sondern auch nicht-apoptotische Funktionen haben, die

unter anderem die Aktivierung, die Proliferation und das Überleben von T-Zellen umfassen (Lamkanfi et al., 2007; Misra et al., 2005; Salmena et al., 2003; Su et al., 2005).

1.2 Apoptose im Immunsystem

Apoptose nimmt im Immunsystem bei der Entwicklung von Lymphozyten und dem Erhalt der zellulären Homöostase eine zentrale Rolle ein. Genetische Modifikationen von pro- und anti-apoptotischen Proteinen stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Immundefizienzen, Autoimmunität und Krebs (Krammer et al., 1994; Thompson, 1995).

1.2.1 Die T-Zellentwicklung

Der Thymus ist das zentrale lymphoide Organ im vorderen oberen Thorax und hat eine einzigartige Bedeutung für die T-Zellentwicklung (Markert et al., 1999; Miller, 1961). Im Thymus durchlaufen unreife Thymozyten eine Reihe von Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen, bevor sie als reife T-Zellen den Thymus verlassen.

Der Thymus besteht aus mehreren Lappen, die in einen äußeren Bereich, den Kortex, und einen zentralen Bereich, die Medulla, unterteilt sind (siehe Abbildung 1.3). Diese thymischen Strukturen unterstützen und steuern die Entwicklung von T-Zellen. Hierbei übernehmen unter anderem nicht-hämatopoetische Stromazellen wie zum Beispiel thymische Epithelzellen (engl.: *thymic epithelial cell*, TEC) und mesenchymale Fibroblasten eine wichtige Funktion (Anderson und Jenkinson, 2001; Peschon et al., 1994). T-Zellen sind während ihrer Entwicklung auf Signale dieser Stromazellen angewiesen und wandern daher durch verschiedene anatomische Strukturen im Thymus (siehe Abbildung 1.3) (Anderson und Jenkinson, 2001).

Im Verlauf der T-Zellentwicklung im Thymus lagern Thymozyten die Gensegmente für ihre Antigenrezeptoren um. Dadurch wird sichergestellt, dass jede T-Zelle einen funktionellen T-Zellrezeptor (TZR) mit nur einer Antigenspezifität exprimiert. Durch die somatische Rekombination der TZR-Gene wird eine enorme Vielzahl von

unterschiedlichen TZR gebildet, die gegen ein breites Spektrum verschiedener Antigene reagieren können. Da der TZR nicht in der Lage ist, freie Antigene zu erkennen, müssen die entsprechenden Antigene über die Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden. Die MHC-Moleküle mit den entsprechenden Antigenen werden von medullären (mTEC) und kortikulären thymischen Epithelzellen (cTEC) exprimiert (Kyewski und Klein, 2006).

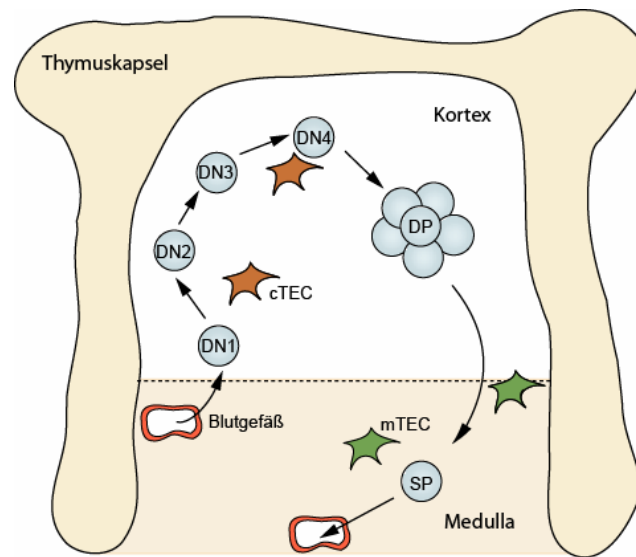


Abbildung 1.3: Die T-Zellentwicklung im Thymus ist durch Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsprozesse gekennzeichnet

Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung. Die Entwicklung ist exemplarisch in einer Thymuskapsel dargestellt. Die T-Zellentwicklung verläuft über das DN-, das DP und das SP-Stadium, bevor die reifen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Thymozyten den Thymus verlassen. Im Verlauf ihrer Entwicklung finden Selektionsprozesse statt, welche die Antigenspezifität und Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenen Zellen sicherstellen. Einzelheiten siehe 1.2.1.

Thymozyten werden aus lymphoiden Vorläuferzellen gebildet, die aus der fötalen Leber bzw. aus dem Knochenmark in den Thymus wandern (Donskoy und Goldschneider, 1992). Hier durchlaufen sie unterschiedliche Entwicklungsstadien, die durch die Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle unterschieden werden können (siehe Abbildung 1.3). Zu diesen Oberflächenmolekülen gehören die Korezeptoren CD4 und CD8. Frühe Vorläufer-T-Zellen exprimieren weder CD4 noch CD8 und werden daher als doppelt-negative Thymozyten ($CD4^-CD8^-$, DN) bezeichnet (von Boehmer, 1988). Sie bilden nur eine kleine Population im Thymus von etwa fünf Prozent. Während ihrer

Entwicklung, die über vier Subpopulationen (DN1, DN2, DN3, DN4) verläuft, wandern die DN-Thymozyten durch den Kortex in das subkapsuläre Epithelium am äußeren Rand des Kortex (siehe Abbildung 1.3) (Lind et al., 2001). Hier beginnen sie zu proliferieren und sich in doppelt-positive Thymozyten ($CD4^+CD8^+$, DP) zu differenzieren. Am Übergang vom DN-Stadium zum DP-Stadium findet die somatische Rekombination der Gene für die γ -, δ - und die β -Ketten des TZR statt, so dass die sich entwickelnden Thymozyten entweder einen $\gamma\delta$ -TZR exprimieren oder den sogenannten prä-T-Zell-Rezeptor (pTZR), der aus der invarianten prä-TZR α -Kette und der β -Kette besteht (Groettrup et al., 1993; Rodewald und Fehling, 1998; Saint-Ruf et al., 1994). Im Folgenden soll auf die $\alpha\beta$ -T-Zellen näher eingegangen werden.

Über den pTZR erhalten DN-Thymozyten Signale, die Proliferation und das Überleben der Zelle sicherstellen und zur Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 führen (von Boehmer und Fehling, 1997). Die DP-Thymozyten sind die größte Population im Thymus. Sie lagern die Gensegmente der α -Kette des TZR um und exprimieren erstmals einen $\alpha\beta$ -TZR (Borgulya et al., 1992; Brandle et al., 1992; Hernandez-Munain et al., 1999). Die Spezifität dieses Rezeptors bestimmt das Schicksal der DP-Thymozyten. Sie sterben entweder (I) durch das Fehlen von Überlebenssignalen den „Tod durch Vernachlässigung“ (engl.: *death by neglect*), werden (II) negativ selektiert und sterben apoptotisch (negative Selektion, siehe 1.2.2) oder sie werden (III) positiv selektiert und entwickeln sich zu reifen T-Zellen (positive Selektion) (siehe Abbildung 1.4). Diese verschiedenen Selektionsmechanismen stellen sowohl Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen als auch die Antigenspezifität des TZR sicher und gewährleisten somit eine effiziente Immunantwort.

Der Tod durch Vernachlässigung ist die Konsequenz fehlender positiver Selektion. Der TZR kann hierbei aufgrund unproduktiver Rekombination der TZR-Gene nicht mit körpereigenen MHC-Molekülen interagieren. Diese Zellen erhalten keine Überlebenssignale, und über 90 % der DP-Thymozyten sterben (Huesmann et al., 1991). Interagiert der TZR jedoch mit körpereigenen Peptid-beladenen MHC, wird die Zelle aktiviert. Dabei ist die Stärke der Interaktion entscheidend für das weitere Schicksal der DP-Thymozyten. Thymozyten, deren TZR mit einer hohen Affinität an körpereigene MHC-Peptid-Komplexe bindet, werden negativ selektiert und sterben durch Apoptose (klonale Deletion) (Palmer, 2003). Eine niedrige Affinität des TZR zu körpereigenen MHC-Peptid-Komplexen resultiert in der Übermittlung von Überlebens- und Differenzierungssignalen (Alam et al., 1996; Liu et al., 1998; Williams et al., 1999).

Die Zellen werden positiv selektiert und entwickeln sich zu einzelpositiven $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -Thymozyten (engl.: *single-positive*, SP). Während der positiven Selektion wandern die SP-Thymozyten aus dem thymischen Kortex in die Medulla, bevor sie den Thymus verlassen und als reife naive $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen im Körper zirkulieren (Starr et al., 2003) (siehe Abbildung 1.3 und 1.4).

Im Folgenden wird näher auf die negative Selektion im Thymus eingegangen.

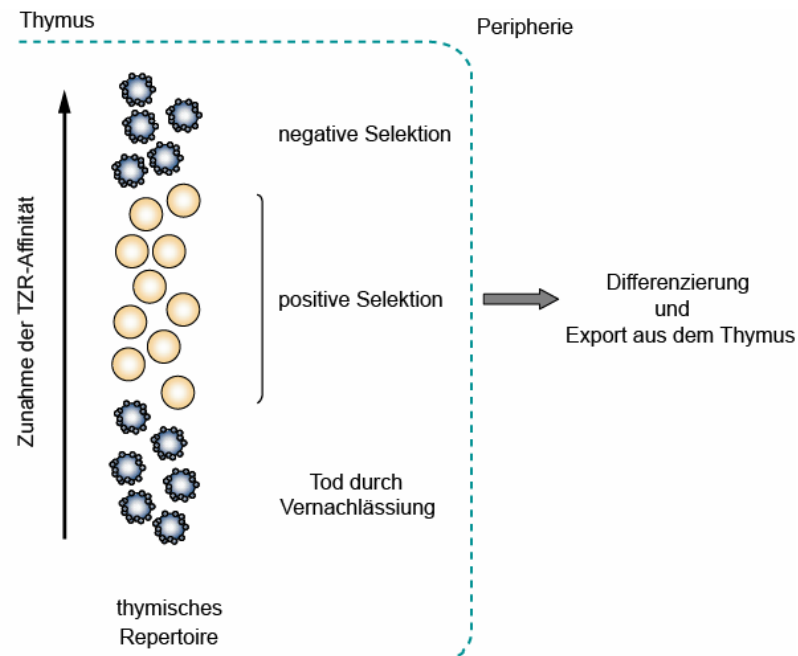


Abbildung 1.4: Die TZR-Affinität zu MHC-Selbstpeptid-Komplexen bildet die Grundlage für die Selektionsprozesse während der T-Zellentwicklung

Die Affinität des TZR zu körpereigenen MHC-Peptid-Komplexen bestimmt das Schicksal der Thymozyten. Eine zu geringe Affinität löst „Tod durch Vernachlässigung“ aus. Eine zu hohe Affinität führt zu TZR-vermittelter Apoptose der Zelle (negative Selektion). Eine mittlere Affinität bewirkt die Differenzierung und Reifung der Zellen (positive Selektion) hin zu SP-Thymozyten. Positiv selektierte Thymozyten verlassen schließlich den Thymus und erfüllen in peripheren lymphatischen Organen ihre unterschiedlichen Funktionen. Einzelheiten siehe 1.2.1 und 1.2.2.

1.2.2 Die negative Selektion

Die negative Selektion ist für die Entwicklung eines funktionellen Immunsystems unentbehrlich, da sie einen effizienten Mechanismus darstellt potentiell selbstreaktive

T-Zellen zu eliminieren. Dadurch wird sichergestellt, dass das generierte T-Zell-Repertoire größtenteils selbsttolerant ist (Sprent und Kishimoto, 2001; Starr et al., 2003). Die negative Selektion im Thymus ist somit die Basis der zentralen Toleranz (Hogquist et al., 2005; Kappler et al., 1987). Demnach können Defekte in der negativen Selektion zu Autoimmunerkrankungen führen.

Die negative Selektion findet mit großer Wahrscheinlichkeit in der thymischen Medulla statt, wo mTEC körpereigene Antigene präsentieren (Hogquist et al., 2005; Laufer et al., 1996; Petrie et al., 1990). Ob die Medulla der einzige Ort ist, an dem negative Selektion stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Möglicherweise kann negative Selektion auch im thymischen Kortex stattfinden, was gegen die räumliche Trennung von positiver und negativer Selektion sprechen würde (Palmer, 2003).

Die Antigenpräsentation erfolgt nicht nur direkt über mTEC, sondern auch über thymische dendritische Zellen, die mTEC-präsentierte Antigene „übernehmen“ können (Gallegos und Bevan, 2004). Um T-Zell-Toleranz gegenüber einem breiten Spektrum körpereigener Antigene zu ermöglichen, wird im medullären Thymusepithel die ansonsten strikte gewebe- und entwicklungsspezifische Regulation der Genexpression aufgehoben. Der Transkriptionsfaktor AIRE (engl.: *autoimmune regulator*) ist für die Genexpression von ansonsten gewebespezifischen Genen in den mTEC verantwortlich (Mathis und Benoist, 2007). Die AIRE-regulierten Proteine umfassen beispielsweise Insulin, das neuronale MBP (engl.: *myelin basic protein*) und die im Magen exprimierte H,K-ATPase (Anderson et al., 2002; Derbinski et al., 2001). Mutationen des *aire*-Gens führen zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen in der Maus und im Menschen (Ramsey et al., 2002a; Ramsey et al., 2002b). Eine Studie mit AIRE-defizienten Mäusen zeigt eine direkte Verbindung zwischen negativer Selektion und Autoimmunität. Trotzdem ist bislang umstritten, ob Autoimmunität durch negative Selektion verhindert wird, da Mäuse mit Mutationen im *cd95*-, *il-2*- oder *foxp3*-Gen, trotz intakter negativer Selektion, Autoimmunkrankheiten entwickeln (Horak, 1995; Nagata und Suda, 1995; Ziegler, 2006).

Die Deletion selbstreaktiver Thymozyten im Thymus findet vermutlich im DP-Stadium oder im frühen SP-Stadium der T-Zellentwicklung statt (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988; Sha et al., 1988; White et al., 1989). Eine genaue Aussage ist schwierig, da viele experimentelle Studien unterschiedliche Modellsysteme für negative Selektion

verwenden. Einige Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Nur77, ein *Orphan-Steroid-Rezeptor*, in Thymozyten, die negative Selektion durchlaufen, stark exprimiert wird und möglicherweise ein wichtiger Regulator für die TZR-induzierte Apoptose in Thymozyten ist (Calnan et al., 1995; Cho et al., 2003; Lee et al., 1995; Zhou et al., 1996).

Die TZR-Signale, welche durch die hochaffine Bindung des TZR an körpereigene MHC-Peptid-Komplexe übermittelt werden, setzen eine Signalkaskade in Gang, die letztendlich zum Tod der Zelle führt. Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie Signale über den gleichen Rezeptor so unterschiedliche Prozesse wie Apoptose und Differenzierung induzieren können. Es wurden zwei Modelle postuliert, welche die unterschiedliche Signalverarbeitung erklären. Das Aviditätsmodell geht davon aus, dass hochaffine MHC-Peptid-Liganden mehr TZR auf der Zelloberfläche binden und besetzen können und der Thymozyt die Anzahl der besetzten TZR „zählt“. Wenn eine bestimmte Anzahl von TZR durch diese Liganden besetzt ist, wird Apoptose ausgelöst. Dieses Modell sagt voraus, dass geringe Mengen hochaffiner MHC-Peptid-Liganden nur wenige TZR besetzen können und positive Selektion induzieren (Ashton-Rickardt et al., 1994; Sebzda et al., 1994). Im zweiten Modell, dem Affinitätsmodell, ist die Zeitdauer, die ein MHC-Peptid-Ligand an einen TZR gebunden ist, für das Schicksal der Thymozyten entscheidend. *Biacore*-Studien haben gezeigt, dass hochaffine MHC-Peptid-Liganden einen TZR für einen längeren Zeitraum besetzen, da sie eine langsamere Dissoziationsrate haben als niedrigaffine Liganden (Alam et al., 1996). Möglicherweise wird die Affinität dadurch bestimmt, dass der Rezeptor die Dissoziationsrate des Liganden „misst“. Übertragen auf die TZR-Signalleitung würde das bedeuten, dass niedrigaffine MHC-Peptid-Liganden frühe TZR-Signale induzieren, hochaffine Liganden hingegen frühe und späte TZR-Signale induzieren können (Goldstein et al., 2004; McKeithan, 1995).

Die Stimulation des TZR löst eine Reihe von intrazellulären Signalen aus, die zunächst TZR-proximal verschiedene Adapterproteine aktivieren. Hierzu gehören unter anderem das TZR-Adapterprotein LAT (engl.: *linker for activation of T cells*) und der Adapter Grb2 (engl.: *growth-factor receptor-bound protein*). Die genetische Deletion von LAT oder Grb2 in Mäusen führt zu negativen Selektionsdefekten (Aguado et al., 2002; Gong et al., 2001; Sommers et al., 2005). Über die TZR-Adapterproteine wird unter anderem der MAPK-Signalweg (engl.: *mitogen-activated protein kinase*) aktiviert. Er umfasst

verschiedene Proteinkinasen, wie zum Beispiel JNK (engl.: *Jun amino-terminal kinase*), ERK1 und ERK2 (engl.: *extracellular-signal-regulated kinase*) sowie die MAP-Kinase p38. Den MAP-Kinasen JNK und p38 wurde eine direkte Rolle bei der negativen Selektion zugeschrieben (Gong et al., 2001; Sugawara et al., 1998). Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass ERK während der negativen Selektion vor JNK und p38 aktiviert wird. Möglicherweise bestimmt die Reihenfolge der Aktivierung der verschiedenen MAPK-Signalwege, welchen Selektionsprozess die Thymozyten durchlaufen (Mariathasan et al., 2001; Werlen et al., 2003; Werlen et al., 2000). Eine weitere Kinase, für die eine Rolle bei der negativen Selektion gezeigt wurde, ist MINK (engl.: *misshapen NIKs-related kinase*). Die Deletion von MINK führt in Mäusen zu Defekten in der negativen, nicht aber positiven Selektion (McCarty et al., 2005).

Es wurde gezeigt, dass die negative Selektion von Thymozyten neben dem Signal über den TZR ein zweites, kostimulatorisches Signal von antigenpräsentierenden Zellen (engl.: *antigen-presenting cells*, APC) in der thymischen Medulla benötigt (Aiba et al., 1994; Amsen und Kruisbeek, 1998; Page et al., 1993; Punt et al., 1994). Zu den kostimulatorischen Molekülen zählen CD28, CD5, CD43, CD80, CD86 und der CD40 Ligand (CD40L) (Foy et al., 1995; Kishimoto und Sprent, 1999; Punt et al., 1994; Williams et al., 2002). Viele Studien sprechen dafür, dass verschiedene kostimulatorische Rezeptoren eine redundante Funktion im negativen Selektionsprozess haben.

Die apoptotischen Signalwege, die der negativen Selektion zugrunde liegen, sind bis heute noch nicht genau bekannt. Die Rolle der TNF-Rezeptor-Familienmitglieder wird kontrovers diskutiert. Die meisten Daten sprechen dafür, dass Todesrezeptor-vermittelte Apoptose bei der negativen Selektion im Thymus keine Rolle spielt. Es konnten keine eindeutigen Hinweise für eine Beteiligung der TNF-Rezeptor-Familienmitglieder CD95, TNF-R1, DR3 und TRAIL gefunden werden (Cretney et al., 2003; Kotzin et al., 1988; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Newton et al., 1998; Page et al., 1998; Walsh et al., 1998). Andere Studien haben die Abhängigkeit des negativen Selektionsprozesses vom intrinsischen Signalweg der Apoptose untersucht. Gegen die Beteiligung des intrinsischen Signalweges spricht die Tatsache, dass Apaf-1- und Caspase-9-defiziente Thymozyten eine normale negative Selektion aufweisen (Hara et al., 2002; Marsden et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnte für die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bim, Bax und Bak eine Schlüsselrolle in der negativen Selektion nachgewiesen werden. Bim-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich verringerte Deletion selbstreaktiver

Thymozyten (Bouillet et al., 2002). Obwohl Bim im Zentrum eines noch nicht genau definierten apoptotischen Signalweges während der negativen Selektion steht, ist nicht bekannt, wie Bim aktiviert wird. Es gibt jedoch Hinweise, dass Bax und Bak für die pro-apoptotische Aktivität von Bim notwendig sind (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001).

Die Rolle der Caspasen im negativen Selektionsprozess ist ebenfalls unklar. Die Beobachtung, dass Caspasen nach TZR-vermittelter Induktion der Apoptose aktiviert werden, spricht dafür, dass Caspaseaktivierung für die negative Selektion notwendig sein könnte (Clayton et al., 1997). Des Weiteren zeigen Studien mit dem Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk in fötalen Thymus-Organokulturen (FTOK) eine Caspaseabhängigkeit der negativen Selektion *in vitro* (Doerfler et al., 2000). Die transgene Expression des Bakulovirus-Caspaseinhibitors p35 in Mäusen bewirkt eine teilweise Blockade des Zelltodes nach Injektion von spezifischen Peptiden oder Antikörpern, die gegen CD3 gerichtet sind (Izquierdo et al., 1999). Allerdings zeigen diese transgenen Mäuse keine Verringerung in der Deletion von Thymozyten nach Superantigen-vermittelter negativer Selektion und in einem TZR-transgenen Selektionsmodell (Doerfler et al., 2000). Da p35 Caspase-1, -3, -4, -6, -7, -8 und -10 inhibiert, muss die Caspaseabhängigkeit der negativen Selektion in Frage gestellt werden. Gegen eine Schlüsselrolle von Caspasen bei der negativen Selektion sprechen auch Studien mit Thymozyten von transgenen Mäusen, die den Caspase-8-Inhibitor CrmA (engl.: *cytokine response modifier A*) exprimieren. Sie weisen keine Defekte bei der Deletion im Thymus auf (Smith et al., 1996). Diese Studien unterstützen die Theorie, dass Thymozyten und periphere T-Zellen unterschiedliche Signalwege nutzen, um Apoptose auszulösen.

1.2.3 Apoptose in peripheren T-Zellen

Nachdem CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen den Thymus verlassen haben, erfüllen sie in den peripheren lymphatischen Organen ihre unterschiedlichen Funktionen als Helfer-T-Zellen (Th1-, Th2- und Th17-Zellen), regulatorische T-Zellen (T_{reg}) oder als zytotoxische T-Zellen.

Naive, unstimulierte T-Zellen weisen eine große Vielfalt unterschiedlicher TZR-Spezifitäten auf, mit denen sie auf Pathogene reagieren können. Allerdings ist die Anzahl dieser spezifischen T-Zellen gering. Aus diesem Grund müssen naive T-Zellen nach ihrer Aktivierung zunächst proliferieren. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über APC, zu denen B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen gehören, und führt zur klonalen Expansion der aktivierten T-Zellen. Für die Expansion der T-Zellen sind neben TZR-Signalen auch kostimulatorische Signale notwendig. Die Kostimulation über CD28 induziert neben der Zytokinexpression auch die Expression anti-apoptotischer Proteine (beispielsweise Bcl-x_L) und verhindert dadurch den Zelltod (Boise et al., 1995; Grillot et al., 1996; June et al., 1987). Im Verlauf einer Immunantwort ändert sich die Apoptosesensitivität der T-Zellen. Zu Beginn ihrer Expansion sind T-Zellen resistent, in der Endphase einer Immunantwort sensitiv gegenüber Apoptose (Krammer, 2000).

Zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase müssen nach der Eliminierung des Pathogens aktivierte, antigenspezifische T-Zellen entfernt werden. Nur wenige antigenspezifische T-Zellen verbleiben im Körper und entwickeln sich zu so genannten Gedächtnis-T-Zellen (Berzins et al., 1999; Strasser und Pellegrini, 2004). Die T-Zell-Deletion in der Endphase einer Immunantwort erfolgt durch Apoptose und wird sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg reguliert. Erhalten aktivierte T-Zellen keine Überlebenssignale durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, wird Zelltod induziert. Dieser Zelltod wird „autonomer Tod aktivierter T-Zellen“ (engl.: *activated T-cell autonomous death*, ACAD) genannt (Hildeman et al., 2002) und findet über den intrinsischen Signalweg statt. Während der Expansionsphase der Immunantwort verändert sich in aktivierten T-Zellen das Verhältnis von anti-apoptotischen zu pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern, so dass sich die Apoptosesensitivität der Zelle erhöht (Arnold et al., 2006; Krammer et al., 2007). Das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bim übernimmt eine Schlüsselrolle und induziert zusammen mit PUMA die Permeabilisierung der Mitochondrien, den Cytochrom c-Ausstrom und den Tod der T-Zelle (Erlacher et al., 2005; Hildeman et al., 2002; Sandalova et al., 2004; Willis et al., 2007). Der autonome Zelltod, ACAD, scheint vor allem bei der Beendigung einer Immunantwort gegen akute Infektionen eine wichtige Rolle zu spielen.

Ein weiterer Weg der T-Zell-Deletion wird durch die Restimulation einer bereits aktivierten T-Zelle ohne ein ausreichendes kostimulatorisches Signal induziert. Dieser aktivierungsinduzierte Zelltod (engl.: *activation induced cell death*, AICD) wird durch

Todesrezeptoren wie zum Beispiel CD95, TNF-R1 und TRAIL-R vermittelt (Dhein et al., 1995; Janssen et al., 2005; Krammer, 2000; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Martinez-Lorenzo et al., 1998; Sytwu et al., 1996). Die Rolle von CD95 ist am detailliertesten untersucht. Aktivierte T-Zellen exprimieren sowohl CD95 als auch CD95L und sind sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, die entweder in derjenigen T-Zelle, die den CD95-Liganden exprimiert, ausgelöst wird (Suizid) oder in benachbarten Zellen (Fratrizid) (Dhein et al., 1995; Nagata und Golstein, 1995). Die Bedeutung von CD95 für die T-Zell-Homöostase wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass *lpr*- (engl.: *lymphoproliferative*) und *gld*-Mäuse (engl.: *generalized lymphoproliferative disease*), die Mutationen im *cd95*- oder *cd95L*-Gen tragen, Defekte in der Auslösung von AICD zeigen und in Folge lymphoproliferative Erkrankungen entwickeln (Takahashi et al., 1994a; Watanabe-Fukunaga et al., 1992a). Andere, CD95-unabhängige AICD-Signalwege tragen ebenfalls zur Regulation der T-Zell-Homöostase bei (Brenner et al., 2007). Während das CD95-System bei der AICD-Initiation notwendig ist, spielt das TNF/TNF-R1-System in der späten Phase des AICD eine wichtige Rolle (Zheng et al., 1995; Zimmermann et al., 1996). Die Bedeutung des AICD liegt vermutlich in der Deletion aktivierter T-Zellen während chronischer Infektionen wie beispielsweise Malaria oder Leishmaniose und verhindert Autoimmunität durch chronisch aktive T-Zellen (Stranges et al., 2007; Strasser, 2005).

1.3 Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod

Nachdem im Jahre 1972 der Begriff Apoptose geprägt wurde, erkannte man, dass der Tod einer Zelle einem Muster von molekularen und morphologischen Veränderungen folgt. Es wurde klar, dass die molekularen Prozesse während der Apoptose in der Aktivierung von Caspasen kulminieren. Den Caspasen wurde lange Zeit eine einzigartige und exklusive Rolle bei der Auslösung von programmiertem Zelltod zugeschrieben. Die unerwartete Beobachtung, dass einige Zellen auch ohne die Beteiligung von Caspasen „programmiert“ sterben können, zeigte die Plastizität des Zelltodprogramms und widerlegte die Theorie, dass Caspasen für den programmierten

Zelltod unentbehrlich sind. So wurde beispielsweise beobachtet, dass Apaf-1-defiziente Zellen nach Überexpression des *BH3-only*-Proteins tBid starben (Cheng et al., 2001), und die ektopische Expression des pro-apoptotischen Moleküls Bax bei gleichzeitiger Caspaseinhibition Zelltod verursachte (Xiang et al., 1996).

In der Literatur findet sich bis heute keine einheitliche Definition des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltodes. Häufig werden morphologische Kriterien zur Charakterisierung der verschiedenen Todesformen herangezogen. Die morphologischen Veränderungen des Caspase-unabhängigen Zelltodes ähneln denen der Apoptose, allerdings zeigt sich nur eine moderate Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Des Weiteren findet häufig keine Abschnürung apoptotischer Körperchen statt (Chipuk und Green, 2005; Leist und Jaattela, 2001a). Im Unterschied zur klassischen Apoptose, bei der die molekularen Signale gut charakterisiert sind, bleibt es bei der Beschreibung des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltodes oft bei einer phänomenologischen Charakterisierung. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass die Induktion über Todesrezeptoren, Zellstressstimuli und den Entzug von Wachstumsfaktoren erfolgen kann (Leist und Jaattela, 2001a). So löst CD95 auch Caspase-unabhängig Zelltod in aktivierten T-Zellen aus (Holler et al., 2000; Vonarbourg et al., 2002). Die Kinase RIP1 (engl.: *receptor-interacting protein 1*) und das Adaptermolekül FADD, dessen Oligomerisierung in Abwesenheit von Caspaseaktivität zu nekrotischem Zelltod führt, spielen hierbei eine wichtige Rolle (Holler et al., 2000; Kawahara et al., 1998). Neben CD95 ist auch TNF-R1 in der Lage, über Caspase-unabhängige Mechanismen Zelltod auszulösen. Werden Mäuse, denen TNF injiziert wurde, mit dem Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk behandelt, zeigt sich eine Verstärkung des oxidativen Stress und eine vermehrte Schädigung der Mitochondrien. Infolgedessen sterben diese Mäuse früher als TNF-behandelte Mäuse. Diese Sensitivierung kann durch Antioxidanzien verhindert werden und impliziert, dass die Bildung von ROS hierfür verantwortlich ist (Cauwels et al., 2003). Beim Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod werden Proteasen aktiviert, die nicht zur Caspasefamilie gehören (Johnson, 2000). Diese Proteasen umfassen unter anderem Calpaine, Serinproteasen wie die Granzyme und lysosomale Cathepsine, auf die später eingegangen werden soll. Über die Regulation, die Aktivierung und die Funktion der Nicht-Caspase-Proteasen während des programmierten Zelltodes ist wenig bekannt. Es ist beschrieben, dass viele dieser Proteasen zumindest einige der klassischen

Caspasesubstrate spalten und somit die Effekte von Caspasen imitieren können (Leist und Jaattela, 2001b; Wang, 2000).

Die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran ist bei einer Vielzahl von Caspase-unabhängigen Todesformen ein zentraler Vorgang. Die Initiierung von MOMP verläuft in den meisten Fällen ohne die Beteiligung von Caspasen und resultiert in der Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle. Diese können entweder Caspase-abhängig Apoptose induzieren, wie im Fall von Cytochrom c, oder ohne die Beteiligung von Caspasen Zelltod einleiten. Zu diesen Molekülen gehören AIF, EndoG und die Serinprotease HtrA2/Omi. Sowohl AIF als auch EndoG und HtrA2/Omi sind als Faktoren beim Caspase-unabhängigen Zelltod beschrieben worden. Wenn AIF und EndoG ins Zytosol freigesetzt werden, translozieren sie in den Nukleus und induzieren dort Caspase-unabhängig die Fragmentierung der DNA (Arnoult et al., 2003; Li et al., 2001; Susin et al., 1999). Ihre Funktion und Beteiligung am Caspase-unabhängigen Zelltod wird jedoch kontrovers diskutiert. So wird die Rolle von AIF durch eine Studie mit Mäusen in Frage gestellt, die eine reduzierte AIF-Expression haben. Diese so genannten „*Harlequin*“-Mäuse (Hq-Mäuse) entwickeln neurodegenerative Krankheiten und erblinden, weil ihre Neuronen durch oxidativen Stress apoptotisch sterben (Klein et al., 2002). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass AIF als wichtiges Enzym im zellulären Redox-Metabolismus auch eine anti-apoptotische Funktion hat (Modjtahedi et al., 2006). HtrA2/Omi wird als pro-apoptotisches Molekül beschrieben, da dessen Überexpression Zelltod induziert, der nicht mit Breitspektrum-Caspaseinhibitoren blockiert werden kann (Martins et al., 2004; Suzuki et al., 2001). Allerdings scheint die pro-apoptotische Funktion von untergeordneter Bedeutung zu sein. Auch HtrA2/Omi wird zunehmend eine Rolle bei der Erhaltung der mitochondrialen Physiologie zugesprochen. Es ist denkbar, dass diese durch MOMP freigesetzten mitochondrialen Moleküle sicherstellen, dass Zelltod selbst bei fehlender Caspaseaktivierung ablaufen kann.

Nicht nur die Mitochondrien haben eine regulatorische Rolle beim programmierten Zelltod. Auch Zellorganellen wie das Lysosom und das endoplasmatische Retikulum (ER) können Leben und Tod einer Zelle kontrollieren (Ferri und Kroemer, 2001).

1.3.1 Die Rolle der Lysosomen während des programmierten Zelltodes

Lysosomen sind von einer einfachen Membran umschlossene Zellorganellen mit einem sauren pH-Wert ($\text{pH} \approx 4,5-5$), die unter anderem für den Abbau und die Wiederverwertung überflüssig gewordener Zellbestandteile und Makromoleküle verantwortlich sind (de Duve, 1983). Der Abbau erfolgt durch katalytische Hydrolasen, deren Aktivitätsoptimum bei saurem pH-Wert liegt. Zu diesen Enzymen zählen Proteasen, Nukleasen, Phosphatasen und Enzyme zum Abbau komplexer Glykolipide und Polysaccharide. Makromoleküle und Zellorganellen erreichen die Lysosomen auf verschiedenen Wegen. Zytosolische Proteine oder gealterte Organellen können durch eine Doppelmembran vom Rest des Zytoplasmas abgetrennt werden und bilden Vesikel, die Autophagosomen. Dieser evolutionär konservierte Prozess wird Autophagie genannt. Die so entstandenen Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen zu Autophagolysosomen, und die umschlossenen Bestandteile werden durch lysosomale Hydrolasen zerlegt (Baehrecke, 2005). Entstandene Abbauprodukte können schließlich weiterverwendet werden. Darüber hinaus wird extrazelluläres Material durch Phagozytose aufgenommen und nach der Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen proteolytisch abgebaut (Bohley und Seglen, 1992). Paradoxerweise wurde Autophagie in Zusammenhang mit programmiertem Zelltod gebracht. Dieser autophagische Zelltod ist durch die Bildung von Autophagolysosomen gekennzeichnet, und im Gegensatz zur Apoptose ist wenig über den Mechanismus und die Gene, die autophagischen Zelltod unter physiologischen Bedingungen regulieren, bekannt (Bergmann, 2007).

Neben ihrer Funktion beim Abbau und der Wiederverwertung von Zellbestandteilen spielen Lysosomen auch während unkontrolliertem zellulären Stress und nekrotischer Zelllyse eine Rolle. Bisher ging man davon aus, dass Lysosomen durch die Freisetzung von lysosomalen Proteasen ausschließlich an der unspezifischen Degradierung von Proteinen beteiligt sind. Überraschenderweise zeigte sich aber in den letzten Jahren, dass Lysosomen und lysosomale Proteasen auch an der Initiierung und Ausführung des programmierten Zelltodes teilnehmen (Brunk et al., 2001; Kroemer und Jaattela, 2005). Studien mit Detergenzien und lysosomotrophen Reagenzien, welche die Integrität der lysosomalen Membran zerstören, zeigen, dass die Permeabilisierung der lysosomalen Membran zum Ausstrom verschiedener Hydrolasen führt und sowohl Apoptose als auch

Caspase-unabhängigen Apoptose-ähnlichen und nekrotischen Zelltod auslösen kann (siehe Abbildung 1.5). Entscheidend für die Art des Zelltodes ist das Ausmaß der lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP). Ein begrenzter Ausstrom des Lysosomeninhalts in das Zytosol induziert Apoptose oder Apoptose-ähnliche Prozesse, während ein fast vollständiger Verlust der lysosomalen Integrität zu unkontrollierter Nekrose führt (Boya et al., 2003; Brunk et al., 1997; Cirman et al., 2004; Kagedal et al., 2001b). LMP kann auch durch „klassische“ Apoptosestimuli wie die Aktivierung von Todesrezeptoren oder intrinsische Signale ausgelöst werden (Brunk und Svensson, 1999; Deiss et al., 1996; Foghsgaard et al., 2001; Werneburg et al., 2004; Yuan et al., 2002). Gelangen lysosomale Proteasen ins Zytosol, können sie entweder mit oder ohne zusätzliche Beteiligung von Caspasen zum Tod der Zelle führen (siehe Abbildung 1.5). Der Mechanismus der selektiven LMP ist bisher nicht bekannt. Eine Hypothese besagt, dass die mehrstufige Prozessierung des intrazellulären Membranlipids Sphingomyelin zu Sphingosin eine Akkumulation von Sphingosin in den Lysosomen hervorruft. In hohen Konzentrationen wirkt Sphingosin wie ein Detergenz und bewirkt LMP (Kagedal et al., 2001b; Werneburg et al., 2002). Ein anderer möglicher Mechanismus ist die Bildung von ROS (siehe Abbildung 1.5). Es wurde gezeigt, dass ROS möglicherweise über einen intralysosomalen Eisen-katalysierten oxidativen Prozess LMP induziert (Antunes et al., 2001; Brunk et al., 2001; Dare et al., 2001; Persson et al., 2003).

Bisher ist nicht bekannt, ob die LMP zu einem selektiven Ausstrom von lysosomalen Hydrolasen führt, oder ob es zu einem unspezifischen Ausstrom aller lysosomalen Hydrolasen kommt. Hinweise auf einen selektiven Ausstrom geben Untersuchungen mit sterbenden Zellen, die mit Fluorochrom-gekoppelten Dextranpartikeln unterschiedlicher Größe beladen wurden. Kleinere Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa wie die lysosomalen Proteasen strömen schneller aus als Moleküle mit einem Molekulargewicht über 70 kDa (Bidere et al., 2003). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Cathepsine durch LMP ins Zytosol gelangen und im Verlauf von programmiertem Zelltod eine Rolle spielen.

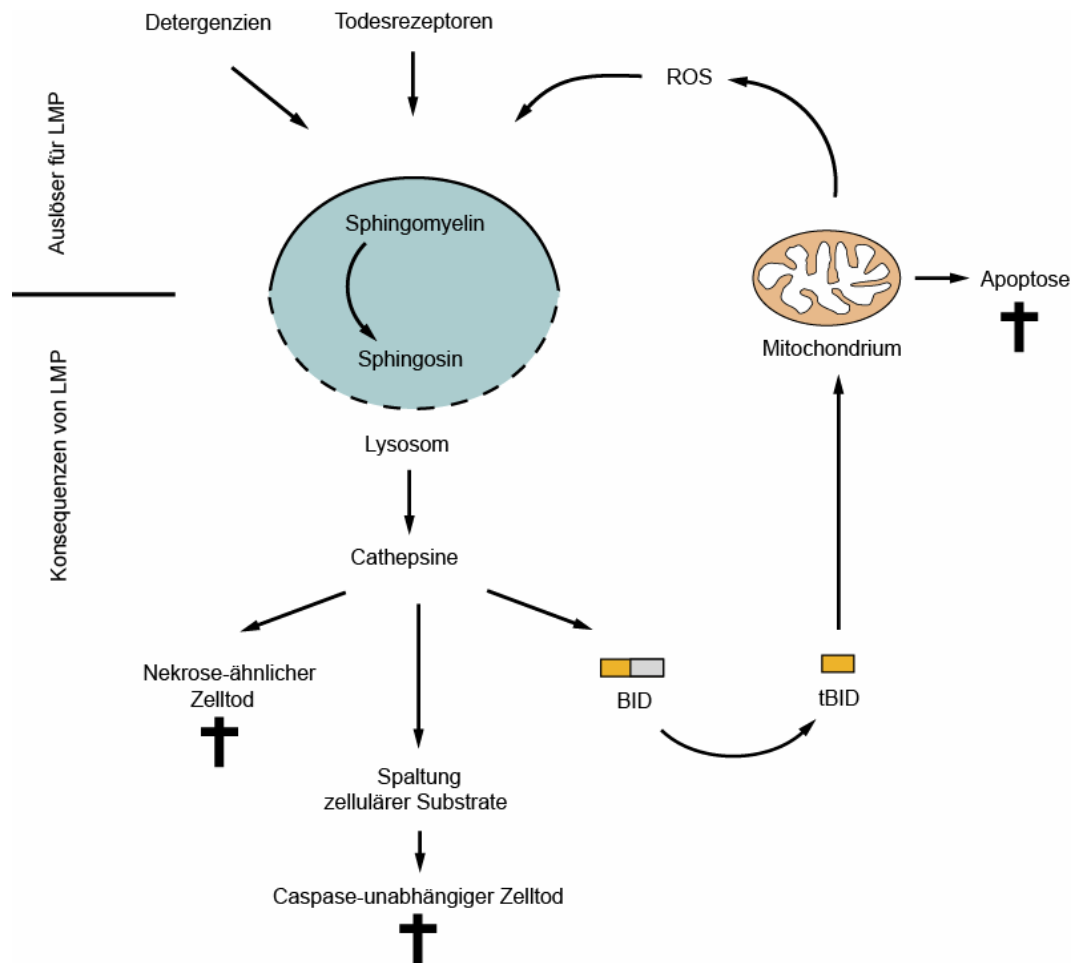


Abbildung 1.5 LMP kann Caspase-unabhängigen und Nekrose-ähnlichen Zelltod sowie Apoptose auslösen

LMP wird durch verschiedene Stimuli bewirkt, wie beispielsweise durch Todesrezeptoren, Detergenzien und ROS. Die Bildung und Akkumulation von Sphingosin in den Lysosomen ist ein Mechanismus, der LMP auslöst. LMP resultiert in der Freisetzung von Cathepsinen aus den Lysosomen ins Zytosol. Eine selektive Freisetzung von Cathepsinen kann zu Caspase-unabhängigem Zelltod oder zu Apoptose führen. Werden Lysosomen massiv permeabilisiert, wird Nekrose-ähnlicher Zelltod ausgelöst. Einzelheiten siehe 1.3.1 und 1.3.3.

1.3.2 Die Cathepsine

Cathepsine bilden eine Gruppe lysosomaler Proteasen, die unter anderem an verschiedenen Formen des programmierten Zelltodes beteiligt sind (Johnson, 2000). Cathepsine gehören zur Papainfamilie und umfassen Serin-, Cystein- und

Aspartatcathepsine. Die am besten charakterisierten Cathepsine sind die Cystein-cathepsine, von denen beim Menschen bislang elf Vertreter beschrieben wurden (Cathepsin B, -C, -F, -H, -K, -L, -O, -S, -V, -X, -W). Sie wirken hauptsächlich als Endopeptidasen in endolysosomalen Vesikeln; nur wenige Cathepsine, wie Cathepsin B, weisen Exopeptidaseaktivität auf. Ihre primäre Funktion besteht darin, Proteine in den Lysosomen wiederzuverwerten und Antigene für die Präsentation über MHC-Moleküle zu prozessieren (Turk et al., 2000; Turk et al., 2001). An diese Funktion sind sie optimal angepasst, da sie eine geringe Substratspezifität besitzen und sie ihr Aktivitätsoptimum in einer reduzierenden Umgebung mit sauren pH-Wert haben.

Cathepsine werden ähnlich wie Caspasen als Zymogene synthetisiert. Nach ihrer Synthese wird zunächst das Präpeptid im ER abgespalten und anschließend das Procathepsin durch die Abspaltung des amino-terminalen Propeptides in späten Endosomen oder Lysosomen aktiviert (Nishimura, 1988). Die proteolytische Aktivierung erfolgt sowohl autokatalytisch bei niedrigem pH-Wert als auch durch andere Proteasen oder Glykosaminoglykane (Nishimura, 1988; Rowan et al., 1992; Rozman et al., 1999). Die Zymogenaktivierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulierung der Cathepsinaktivität, ein weiterer ist die Hemmung aktiver Cathepsine durch endogene Inhibitoren (Turk et al., 2000). Die meisten dieser Inhibitoren gehören zur Proteinfamilie der Cystatine, die aufgrund von Sequenzhomologien in Stefine (intrazelluläre Inhibitoren), Cystatine und Kininogene (beide extrazelluläre Inhibitoren) eingeteilt werden (Turk und Bode, 1991). Die Cystatine binden mit geringer Selektivität an das aktive Zentrum von Cathepsinen und verhindern so die Spaltung von Substraten.

Studien mit Mäusen, die defizient für ein oder mehrere Cathepsine sind, trugen entscheidend dazu bei, die physiologische Rolle der verschiedenen Cathepsine zu verstehen. Sie sind nicht nur für die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle notwendig (Nakagawa et al., 1998; Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999), sondern unter anderem auch für eine normale Morphologie der Haarfollikel von Bedeutung (Roth et al., 2000). Einige Cathepsine wie Cathepsin K können sekretiert werden und besitzen eine extrazelluläre Funktion, beispielsweise beim Umbau der extrazellulären Matrix (Buck et al., 1992) oder Restrukturierung des Knochens (Xia et al., 1999). Die Sekretion von Cathepsinen in den extrazellulären Raum kann jedoch auch zu Schäden in der Umgebung der Zelle führen und steht mit pathologischen Befunden, wie zum Beispiel Krebserkrankungen, in Zusammenhang. Verschiedene Cathepsine werden in Tumoren überexprimiert und sind bei der Tumorprogression beteiligt (van der Stappen et al.,

1991). Die Erhöhung der Cathepsinexpression erfolgt sowohl über Genamplifikation und epigenetische Kontrolle, als auch über transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation, etwa über die Stabilität der mRNA (Mohamed und Sloane, 2006). Tumore, die Cathepsine überexprimieren, sekretieren diese häufig in den Extrazellularraum. Dort bewirken Cathepsine den Abbau der extrazellulären Matrix und erhöhen infolgedessen die Invasivität des Tumors und seine Fähigkeit zur Metastasierung (Kos und Lah, 1998; Mohamed und Sloane, 2006). Speziell im Fall von Cathepsin B wurde eine Korrelation zwischen der Cathepsinaktivität im Tumorgewebe und der Aggressivität des Tumors gezeigt (van der Stappen et al., 1991).

Im Zusammenhang mit programmiertem Zelltod wurde die Freisetzung von Cathepsinen aus dem Lysosom beschrieben und deren Beteiligung an verschiedenen Formen Caspase-abhängigen und Caspase-unabhängigen Zelltodes postuliert (Leist und Jaattela, 2001b). Hierbei spielen die Cysteincathepsine B und L und das Aspartatcathepsin D eine prominente Rolle. Die Beteiligung von Cathepsin D wurde im Zusammenhang mit Zelltod dokumentiert, der durch Zytokine, den Breitspektrum-Kinaseinhibitor Staurosporin, Todesrezeptoren, oxidativen Stress, Sphingosine oder den Tumorsuppressor p53 ausgelöst wurde (Bidere et al., 2003; Deiss et al., 1996; Demoz et al., 2002; Kagedal et al., 2001a; Kagedal et al., 2001b; Roberg et al., 1999; Roberg und Ollinger, 1998; Wu et al., 1998). Cathepsin L wurde als Regulator UV-induzierter Apoptose in Keratinozyten und in einem Modell von Etoposid-induziertem Zelltod beschrieben (Hishita et al., 2001; Tobin et al., 2002; Welss et al., 2003). Auch Cathepsin B ist in verschiedenen Formen des Zelltodes involviert. So konnte die Beteiligung an TNF-induziertem Zelltod in primären Hepatozyten und Tumorzellen nachgewiesen werden (Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2000; Guicciardi et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass Glukokortikoide in Thymozyten Apoptose über einen Cathepsin B-abhängigen Verstärkungsmechanismus auslösen können. Demnach wird Cathepsin B nach Glukokortikoidstimulation aktiviert und aus den Lysosomen in das Zytosol freigesetzt. Dort aktiviert Cathepsin B Caspasen und kann zur Chromatinkondensation beitragen (Wang et al., 2006).

Trotz zahlreicher Studien zur Beteiligung von Cathepsinen am programmierten Zelltod sind viele Fragen nach dem Mechanismus und der funktionellen Verbindung zu klassischen Apoptosewegen noch ungeklärt. LMP findet vermutlich vor MOMP statt. In einigen Modellen ist die Regulation des Zelltodes ausschließlich von Cathepsinen

abhängig, in anderen sind sowohl Cathepsine als auch Caspasen beteiligt. Eine diesbezüglich wichtige Studie untersuchte die Beteiligung von Cathepsin B an TNF-induzierter Caspase-8-abhängiger Apoptose. Der Vergleich von Cathepsin B-defizienten Mäusen mit Wildtypmäusen zeigt, dass die durch TNF ausgelöste Apoptose der Hepatozyten in Cathepsin B-defizienten Mäusen deutlich reduziert ist (Guicciardi et al., 2001). *In vitro* bewirkt Cathepsin B den Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien, so dass Cathepsin B in der TNF-Kaskade vermutlich oberhalb der Mitochondrien aktiviert wird (Guicciardi et al., 2000). Übereinstimmend mit diesem Modell wurde das pro-apoptotische *BH-3-only*-Protein Bid als Cathepsinsubstrat beschrieben. Die Spaltung von Bid führt zu einem Cathepsin B-vermittelten Cytochrom c-Ausstrom *in vitro* (Blomgran et al., 2007; Cirman et al., 2004; Stoka et al., 2001). Die Rolle von Bid während des Cathepsin B-vermittelten Zelltodes *in vivo* ist allerdings fraglich (Houseweart et al., 2003).

Offenbar aktivieren Cathepsine bei der Ausführung von programmiertem Zelltod nicht einen einzelnen spezifischen Signalweg, sondern nutzen vielmehr verschiedene molekulare Wege, welche häufig in klassische Apoptosewege integriert sind. Somit fehlt bisher eine einheitliche Definition des Cathepsin-abhängigen Zelltodes.

1.4 Ziel der Arbeit

Der programmierte Zelltod spielt eine bedeutende Rolle in der Ontogenese mehrzelliger Organismen und dient der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Eine besondere Bedeutung kommt dem programmierten Zelltod im Immunsystem zu, sowohl bei der Reifung von Lymphozyten als auch bei der Einschränkung der aktivierungsabhängigen Proliferation reifer Lymphozyten. So ist die Eliminierung von T-Zellen über Apoptose von entscheidender Bedeutung für die T-Zell-Homöostase im Immunsystem, für Selbsttoleranz, Immunsuppression und das Abschalten einer Immunantwort. Verminderte Apoptose kann zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen und zur Tumorentstehung führen. Im Gegensatz zur Apoptose reifer T-Zellen sind die Apoptosemechanismen während der T-Zellentwicklung bislang unverstanden.

Auf molekularer Ebene ist Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen charakterisiert, welche die morphologischen Veränderungen sterbender Zellen hervorrufen. In den letzten Jahren wurde jedoch die exklusive Caspase-Abhängigkeit des programmierten Zelltodes in Frage gestellt, da Zellen auch ohne die Beteiligung von Caspasen sterben können. Bei diesen Formen des Caspase-unabhängigen Zelltodes übernehmen Nicht-Caspase-Proteasen, wie zum Beispiel Cathepsine, eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Thymozyten auch ohne die Beteiligung von Caspasen sterben können und welche Proteasen an solch einem Caspase-unabhängigen Zelltod beteiligt sind. Hierzu soll ein *in vitro*-Modell für den Zelltod in Thymozyten etabliert werden, das biochemische Untersuchungen ermöglicht. Als *in vitro*-Modell wurde die thymische Lymphomzelllinie D ausgewählt und im Hinblick auf die Caspase-Abhängigkeit von aktivierungsinduzierten Zelltod nach PMA/Ionomyzin-Stimulation getestet. Das Ziel dieser Arbeit ist, den Zelltod dieser Zelllinie auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Anschließend sollen die Ergebnisse mit TZR-vermitteltem Zelltod in primären Thymozyten verglichen werden, um Hinweise auf den molekularen Apoptosemechanismus bei der negativen Selektion im Thymus zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Häufig verwendete Puffer

ACK-Lysepuffer (10x):	41,45 g	NH ₄ Cl	
	5 g	KHCO ₃	
	0,186 g	EDTA	
	ad 500 ml H ₂ O	pH 7,27	
Annexin-Bindungspuffer:	10 mM	HEPES	
	140 mM	NaCl	
	2.5 mM	CaCl ₂	pH 7,4
Caspase-Aktivitätspuffer:	50 mM	Hepes	pH 7,4
	50 mM	NaCl	
	0,1%	CHAPS	
	10 mM	EDTA	
	5 % (v/v)	Glycerol	
	10 mM	DTT	
Cathepsin-Aktivitätspuffer:	0,1 M	Phosphatpuffer	
	1 mM	EDTA	
	pH 6,0		

DNA-Probenpuffer (10 x):	50 % (v/v)	Glycerol
	0,42 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,42 % (w/v)	Xylencyanol
HBS (10x):	28 ml	5M NaCl
	10 ml	1M KCl
	11,91g	Hepes
	10 ml	200mM Na ₂ HPO ₄
	ad 100 ml H ₂ O	pH 6,5
KCM-Puffer (5x):	500 mM	KCl
	150 mM	CaCl ₂
	150 mM	Mg Cl ₂
Kinasepuffer:	50 mM Tris-HCl	pH 7,4
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	EDTA
Lysepuffer: (Ganzzellextrakte)	120 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	PMSF
	1 % (w/v)	NP-40
	5 mM	DTT
	25 mM	NaF
	200 µM	Na ₃ VO ₄
	0,5 µg/ml	Pepstatin
MES Puffer:	25 mM	2-(N-morpholino)- Ethansulfonsäure
	5 mM	DTT
	pH 5,0	
Nicolettipuffer:	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat

	0,1 % (w/v)	Triton X-100	
	50 µg/ml	Propidiumiodid	
PBS:	137 mM	NaCl	
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	pH 7,4
PBST:	PBS		
	0,05 % (w/v)	Tween-20	
	pH 7,4		
Probenpuffer reduz. (5x): (SDS-PAGE)	50 % (v/v)	Glycerol	
	10 % (w/v)	SDS	
	50 mM	Tris	pH 6,8
	25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau	
Laufpuffer: (SDS-PAGE)	25 mM	Tris-Base	
	0,19 M	Glycin	
	1 % (w/v)	SDS	
Sammelgel (5 %): (SDS-PAGE)	24 mM	Tris-HCl	pH 6,8
	5 % (w/v)	Acrylamid	
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,1 % (w/v)	APS	
	0,1 % (w/v)	TEMED	
Trenngel: (SDS-PAGE)	37,5 mM	Tris-HCl	pH 8,8
	10-12 % (w/v)	Acrylamid	
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,03 % (w/v)	APS	
	0,1 % (w/v)	TEMED	

Stripping Puffer:	0,1 M pH 1,3	Glyzin
TAE:	40 mM 20 mM 1 mM pH 8,3	Tris Essigsäure EDTA
Transferpuffer: (Western Blot)	25 mM 0,19 M 20 % (v/v) 0,037 % (w/v)SDS	Tris Glycin Methanol

2.1.3 Biologisches Material

2.1.3.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
BL21(DE3)pLysS	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Herkunft	Referenz
Jurkat	humanes T-Zell-Lymphom	(Schneider <i>et al.</i> 1977c)
293T	humane embryonale Nierenzelllinie	(Graham FL, 1977)
D	murine thymische Lymphomzelllinie	(Krammer <i>et al.</i> 1976)

DC27.1	murine T-Zell-Leukämiezelllinie	
308	murine thymische Lymphomzelllinie	(Krammer <i>et al.</i> 1976)
E20	murine thymische Lymphomzelllinie	(Krammer <i>et al.</i> 1976)

2.1.3.3 Mäuse

Die Mäuse wurden von der Firma Charles River Laboratories bezogen oder im hauseigenen Tierstall gezüchtet.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
CatB ^{-/-} (ko)	Cathepsin B-defizient	(Deussing <i>et al.</i> , 1998)
wild-typ (wt)	C57BL6	(Schneider <i>et al.</i> 1977a)

2.1.4 Nährmedien

2.1.4.1 Medien für die Zellkultur

Pulverisierte Zellkulturmedien RPMI 1640, DMEM wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein) bzw. Sigma (München) bezogen und nach Herstellerangaben in pyrogenfreiem Wasser gelöst. Die Medien wurden sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen versetzt:

10 % (v/v)	FCS	Gibco/BRL, Eggenstein
1 %	Natriumpyruvat	Gibco/BRL, Eggenstein

Für murine T-Zelllinien und murine primäre T-Zellen wurden dem Medium 50 µM β-Mercaptoethanol hinzugeben. Für murine primäre T-Zellen wurde dem Medium außerdem 50 µg/ml Gentamycin (Gibco/BRL, Eggenstein) zugegeben.

2.1.4.2 Medien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Caseinhydrolysat
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 pH 7,2 mit 1 M NaOH eingestellt

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

2.1.5 Antikörper

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Name (Klon; Serum/Isotyp)	Antigen	Quelle/Referenz
anti-B220 (Ratte IgG2a, κ)	CD45R	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD25, PE (Ratte IgG2a, κ)	CD25, IL 2Rα	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD4, FITC (Ratte IgG2a, κ)	CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD8, PE (Ratte IgG2a, κ)	CD8	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD95R (Jo2), FITC (Hamster IgG2*, λ2)	CD95R, Fas	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Hamster IgG	IgG	Caltag Laboratories, Karlsruhe
anti-TCRβ, FITC (Hamster IgG2*, λ1)	TCRβ	BD Pharmingen, Heidelberg

Antikörper für Western Blot

Name (Klon; Serum/Isotyp)	Antigen	Quelle/Referenz
anti-Bim (Kaninchen, polyklonal)	humanes synthetisches Bim-Peptid	Stressgen, USA
anti-Caspase-3 (Kaninchen, polyklonal)	humanes synthetisches Caspase-3-Peptid	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
anti-Caspase-8 (3B10, Ratte IgG1)	Caspase-8, p18-Untereinheit	Alexis, Lausen, Schweiz
anti-Caspase-9 (Kaninchen, polyklonal)	Caspase-9-Peptid	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
anti-Cathepsin B (Ziege, polyklonal)	rekombinantes murines Cathepsin B	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-Cathepsin B Klon S12 (Kaninchen, polyklonal)	human, N-Terminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Erk1	Erk1	BD Transduction, Heidelberg
anti-IgG1, HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2a	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-JNK1 (C17) (Kaninchen, polyklonal)	JNK1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Kaninchen, HRP (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p-Erk1/2 (E10, Maus IgG1)	p-Erk1-Peptid	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
anti-p-JNK (G9, Maus IgG1)	p-JNK-Peptid	Cell Signalling Technology, Danvers, USA

anti-SLP76 (C20, Ziege, polyklonal)	SLP76-Peptid, C-Terminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Ziege, HRP (Esel, polyklonal)	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Antikörper für Immunfluoreszenz

Name (Klon; Serum/Isotyp)	Antigen	Quelle/Referenz
anti-Cathepsin B (Ziege, polyklonal)	rekombinantes murines Cathepsin B	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-LAMP 2 (Kaninchen, polyklonal)	LAMP2-Peptid, C-Terminus, Ratte	Alexis, Lausen, Schweiz
anti-Ziege, FITC (Esel, polyklonal)	Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.6 Apotosestimuli, Inhibitoren und Proteasesubstrate

Substanz	Spezifität	Hersteller, Referenz
anti-CD3 (145-2C11), (Hamster, polyklonal)	CD3 (murin)	BD Biosciences, Heidelberg
Annexin V FITC	Phosphatidylserin	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin-FA-fmk	Inhibitor für Cathepsin B/L	Mdbiosciences, Zürich
CA-074-me	Inhibitor für Cathepsin B	Peptide International, Osaka
z-DEVD-AFC	fluoreszenzmarkierter Inhibitor für Caspase-3	Bachem, Weil am Rhein

LZ-CD95L	Leuzin-Zipper CD95 Ligand		(Walczak <i>et al.</i> , 1999)
z-IETD-AFC	fluoreszenzmarkierter Inhibitor für Caspase-8		Bachem, Weil am Rhein
Ionomyzin			Calbiochem, Darmstadt
PD 150606	Inhibitor für Calpain		Calbiochem, Darmstadt
PMA	Phorbol-12-myristat-13-azetat		Calbiochem, Darmstadt
q-VD-OPh	Breitspektrum-Inhibitor für Caspasen		R&D Systems, Minneapolis, USA
z-FA-fmk	Inhibitor für Cathepsin B/L		R&D Systems, Minneapolis, USA
z-RR-AMC	fluoreszenzmarkierter Inhibitor für Cathepsin B		Bachem, Weil am Rhein
z-VAD-fmk	Breitspektrum-Inhibitor für Caspasen		Bachem, Weil am Rhein

2.1.7 Molekularbiologische Materialien

2.1.7.1 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden, soweit nicht anders angegeben, von MWG-Biotech bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')
mGAPDH_for	CCA GTG AGC TTC CCG TTC
mGAPDH_rev	GAA CAT CAT CCC TGC ATC CA
mCD95L_for	TTC ATC TTG TGG GCC TAG

mCD95L_rev	CAA GAC TGA CCC CGG AAG TA
mCTSB_for	nicht öffentlich (Qiagen, Hilden)
mCTSB_rev	nicht öffentlich (Qiagen, Hilden)
mSLP76-3`_for	TAG ACT GTT AAC TCG GGC CC
mSLP76-3`_rev	CAG GAA GTT ATC CCC ACA TCG
mSLP76-5`_for	TTT CGC TCA GAGGTC CTA GCC
mSLP76-5`_rev	GCT TCT GTC TAT TGA TGG AGC AGG
mSLP76-c_for	CAC TAC CTT CCA TGA GCT CC
mSLP76-c_rev	GTT TAT CTT CCT CAG AGC AGC
mG3PDH_for	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
mG3PDH_rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
siRNA-CTSB # 2	nicht öffentlich (Qiagen, Hilden)
siRNA-CTSB # 3	nicht öffentlich (Qiagen, Hilden)

2.1.7.2 Enzyme und Kits

Enzym/Kit	Hersteller, Bezugsquelle
Taq DNA Polymerase	Roche Pharmaceuticals, Mannheim
Roti®-Quant	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Maxi – Präp. Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
Rnase Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt

Turbo-DNA-free Kit	Ambion, Darmstadt
Sybr Green PCR Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
rekombinantes murines Cathepsin B	R&D Systems, Minneapolis, USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Kit	Perkin Elmer, Massachusetts
RNA-Microkit	Stratagene

2.1.8 Geräte

Gerät		Hersteller
Autoradiographiehüllen		Rego
Blotapparatur Semi-Dry	20 x 25 cm	Bio-Rad
Brutschrank Stericult Inkubator		Forma Scientific
FACSCan (Durchflusszytometer)		Becton Dickinson
FACSDiva (Durchflusszytometer, Zellsorter)		Becton Dickinson
FACSCanto (Durchflusszytometer)		Becton Dickinson
FACSVantage (Durchflusszytometer, Zellsorter)		Becton Dickinson
Gefrierschränke:	-20°C	Liebherr
	-80°C	Forma Scientific
Gelelektrophoresekammer	SDS-PAGE	CTI

Heizbad		Köttermann
Zytospin		Shandon
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Lichtmikroskop ID 02		Zeiss
Phasenkontrastmikroskop Labovert FS		Leitz
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2		Zeiss
Mikrowellengerät Micromaxx		Medion AG
Minigelelektrophoresekammer		Bio-Rad
Victor 1420 Multilabel Reader		Wallac
Netzgerät Electrophoresis Power Supply Consort 865		Renner
pH-Meter WTW		WTW
Photoeinheit	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
Spekto-Photometer 6505 UV/Vis		Jenway
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160		Agfa-Gevaert
Geltrockner		Biorad
Schüttelinkubator Certomat HK		Braun
Thermocycler	DNA Engine DYAD	MJ
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Mettler

	Präzisionswaage PE 3600	Mettler
Zählkammer Neubauer		HBG
Zentrifugen:	Biofuge A	Heraeus
	Biofuge Fresco	Heraeus
	Megafuge 1.OR	Heraeus
	Omnifuge 2.ORS	Heraeus
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS, 5C PLUS	Beckmann,

2.1.9 Software

Folgende Computersoftware wurde verwendet: Microsoft Office, CellQuestPro, FlowJo, Adobe Illustrator CS, Adobe Photo Shop CS, Adobe Acrobat 6, Reference Manager.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid-Maxi-Kit durchgeführt. Dafür wurden 400 ml LB-Medium in einem 1 l-Fernbachkolben mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin versetzt und mit einer Einzelkolonie von

einer LB-Agar-Platte angeimpft. Nach Inkubation über Nacht (ü. N.) bei 37°C unter Schütteln wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (Sorvall GS-3, 10 min, 5000 rpm, 4°C) und die Bakterien in 12 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 12 ml des Lysepuffers P2 zugegeben, und das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 12 ml eiskaltem Puffer P3 wurden Proteine und chromosomale DNA gefällt. Es wurde 20 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (Sorvall SS-34, 30 min, 20000 x g und 4°C). Der Überstand wurde auf eine Anionen-Austauschersäule (Qiagen-tip 500) gegeben, die zuvor mit 6 ml Puffer QBT äquilibriert worden war, wobei die Plasmid-DNA unter den gegebenen pH- und Salzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden blieb (1,6 M Salz, pH = 7,0). Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml-Röhrchen eluiert und mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (Heraeus Varifuge, 30 min, 6000 rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet in 5 ml eiskaltem 70 % igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend im Vakuum getrocknet und in 200 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.2.1.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen schaffen. Im ersten Schritt hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer) mit der hitzedenaturierten einzelsträngigen DNA zu einem doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerasen, welche dann im zweiten Schritt doppelsträngige DNA aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisieren. Durch Hitzeeinwirkung trennen sich die komplementären Einzelstränge im dritten Schritt und können schließlich erneut mit den Primern hybridisieren, so dass sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)
1 µl	Primer 1 (200 pmol)
1 µl	Primer 2 (200 pmol)
20 ng	Template DNA
1 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Start	5 min bei 94°C
25-35 Zyklen	Denaturierung 1 min bei 94°C
	Annealing 1 min je nach Primer
	Elongation 1 min bei 72°C
Termination	10 min bei 72°C

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die über PCR amplifizierte DNA-Fragmente können im analytischen Agarosegel (TAE, 1% Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Dazu wurden die PCR-Probe mit DNA-Probenpuffer versehen, in Geltaschen pipettiert und 20-60 min bei 100 V aufgetrennt. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben den zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch aufgetragen.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 254$ nm) sichtbar gemacht und photographiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle und führt so durch Anregung mit UV-Licht zur Fluoreszenz.

2.2.1.4 Transformation von Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA zwecks Amplifikation in Bakterien eingebracht. Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienten kompetente Bakterien der *Escherichia coli*-Stämme BL21(DE3)pLysS. Für die Transformation wurden jeweils

100 µl kompetente Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 10 µl DNA-Lösung (ca. 100 - 200 ng DNA) zusammen mit 20 µl 5 x KCM und 70 µl H₂O zugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, im Anschluss daran eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit je 900 µl Antibiotika-freiem LB-Medium versehen und 60 min bei 37°C zur Induktion der Antibiotika-Resistenzen inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien erfolgte in Petrischalen mit Antibiotika-haltigem LB-Agar ü.N. bei 37°C. Zur Plasmid-DNA-Gewinnung im größeren Maßstab diente anschließend die Maxipräparation.

Zur Herstellung der kompetenten Bakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und auf eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert. Nach Zentrifugation der Bakterienlösung bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C wurden die Pellets in 7,5 ml TSB-Medium resuspendiert (5% [v/v] DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10% [w/v] PEG 6000 in LB-Medium). Die resuspendierten Zellen wurden für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl-Aliquots in Stickstoff schockgefroren und für die Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.2.1.5 Isolierung von RNA

Die Isolation von RNA aus Zelllinien erfolgte mit saurer, phenolischer Guanidin-Lösung. Guanidinthiocyanat denaturiert Proteine effektiv. Eine 4 M Guanidinthiocyanat-Lösung (pH 4,0) erlaubt zusammen mit einer organischen Phenol/Chloroform-Phase die Isolation von Gesamt-RNA. Unter diesen Bedingungen sind Proteine und kleine DNA-Fragmente in der organischen Phase gelöst, und die genomische DNA bleibt in der Interphase, während die RNA in der wässrigen Phase gelöst ist.

5x10⁶ Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (3500 rpm, 4°C, 3 min) und in 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert, bis ein homogenes Lysat entstand. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, mit einem Vortexer gemischt und das Gemisch zentrifugiert (13 000 rpm, 4°C, 5 min). Die transparente wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und durch Invertieren gemischt. Das Gemisch wurde für 1 h bei -20°C inkubiert und dann zentrifugiert (13 000 rpm, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zum Waschen mit 1 ml 70 % Ethanol überschichtet. Das Gemisch wurde erneut bei 13 000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das RNA-Pellet bei RT getrocknet.

Die Isolierung von RNA primärer Thymozyten erfolgte unter Verwendung des RNA Microprep Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l Lysepuffer lysiert und mit 200 μ l 70 %igem Ethanol versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über Bindung an Säulen (RNA-Binding Spin Cup) und Waschen mit 2 x 500 μ l Hoch- und 3 x 300 μ l Nidrigsalzpuffer. Die RNA wurde in 40 μ l Wasser (60°C) eluiert.

2.2.1.6 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Mittels reverser Transkription kann aus Gesamt-RNA cDNA hergestellt werden. Oligo-dT hybridisieren an den polyA-Schwanz der mRNA und werden als Primer für die RT-Reaktion eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit Oligo-dT für 10 min bei 72°C inkubiert. Danach wurde der gesamte Reaktionsansatz (zusätzlich 1 U/ μ l RNase-Inhibitor, 1 mM dNTPs, 10 μ l 10 x Reaktionspuffer, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 U/ μ l Reverse Transkriptase, Gesamtvolumen 100 μ l) für 45 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 90°C inaktiviert.

2.2.1.7 Quantitative Sybr Green PCR

Bei der Echtzeit-PCR werden wie bei der konventionellen PCR-Methode DNA-Abschnitte vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden jedoch durch die Messung entstehender Fluoreszenz schon während des Laufs nachgewiesen. Mit der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die detektierte Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist sequenzspezifisch, da nicht stark bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Veränderungen der Fluoreszenzen wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequenz Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus gemessen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 μ l in Triplikaten durchgeführt.

Reaktionsschema:

Primerkonz. (nM))	300/300
Primer (forward) (μ l)	5,3
Primer (reverse) (μ l)	5,3
Sybr-Green-Mix (μ l)	27,6

cDNA (µl)	17,5
H ₂ O (µl)	31,9

Der Sybr-Green-Mix enthielt 300 µl 10 x Sybr-Green-Puffer, 360 µl 25 mM MgCl₂, 240 µl dNTPs (je 10mM), 15 µl U/µL Hot Gold Star Enzym und 30 µl U/µl Uracil-N-Glycosylase. Alle verwendeten Primer wurden in einer Konzentration von 300 nM eingesetzt.

2.2.1.8 RNA-Oligo-basierende RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich auftretender zellulärer Mechanismus zur sequenzspezifischen Inhibition der Proteinexpression durch kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (Fire et al., 1998), sogenannte siRNAs (small interfering RNA). siRNAs binden intrazellulär an den RISC-Proteinkomplex (RNA-Induced Silencing Complex), der eine RNase-Aktivität aufweist. Am RISC-Proteinkomplex wird die doppelsträngige siRNA entwunden und in den Komplex integriert. Über Watson-Crick-Basenpaarungen bindet die nun einzelsträngige siRNA den RISC-Proteinkomplex an die komplementäre mRNA, die daraufhin degradiert wird.

Zur Herunterregulation der murinen CatB-Expression wurden CatB-spezifische kommerzielle siRNA-Oligomere (Qiagen) verwendet. Die Transfektion der siRNA-Oligonukleotide erfolgte durch Lipofektion, wobei 0,2 µg – 0,4 µg der jeweiligen siRNA verwendet wurden. Vor der experimentellen Nutzung der Zellen wurden diese für mindestens 48-72 h im Inkubator aufbewahrt.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen (Laemmli 1970) mit einem 10-12 % Acrylamid-Trenngel und 5 % Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Für das Giessen und den Lauf der Gele wurde das Mini Protean II-System verwendet (BioRad, München). Die Gele hatten folgende Dimensionen:

Sammelgel: 80 mm x 15 mm x 0,75-1,5 mm

Trenngel: 80 mm x 55 mm x 0,75-1,5 mm

Die Gelzusammensetzung ist in Abschnitt 2.1.2 aufgeführt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min bei 20 °C wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation (10 min) wurden die Gele beladen. Proteinlösungen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 Volt für 1-2 h.

2.2.2.2 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamid-Gelen auf Membranen wurde ein "Nass"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden zwei Whatmann-Filterpapiere, Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), Gel und wiederum zwei Filterpapiere in einer Blotkassette aufeinandergelegt und in die vollständig mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gesetzt. Der Transfer erfolgte bei 2,5 mA/cm² für mindestens 2,5 h bei 4 °C. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T 0.1 % bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem kurzem Waschen in TBS-T 0.1 % wurde die Membran mit dem Primärantikörper für 16 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min mit TBS-Tween 0.1 % gewaschen und die Membran mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20.000 in PBS-T 0.1 %) für 60 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde der Blot mit der ECL-Reaktion (Amersham-Buchler) entwickelt und auf Autoradiographie-Filmen exponiert.

2.2.2.3 Lyse von eukaryontischen Zellen

Für die Präparation von Ganzzell-Extrakten wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (3500 rpm, 4°C, 3 min). Das Zellpellet wurde in 100-500 µl Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile der Lysate wurden anschließend für 20 min bei 11.000 x g pelletiert und die geklärten Überstände in ein neues Eppendorfgeläß überführt. Die Lysate wurden entweder direkt in einer Immunpräzipitation oder SDS-PAGE eingesetzt bzw. zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellen in Lysepuffer (siehe II.1.2) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Kerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand des Lysates wurde dann für die Immunpräzipitation verwendet, wobei 30 µl an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörper eingesetzt wurden. Die Immunpräzipitationen erfolgten ü.N. bei 4°C auf einem Überkopfschüttler.

2.2.2.5 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden aus Zellkultur-Überständen von Hybridomkulturen aufgereinigt. Die Überstände wurden über eine Protein A-Sepharose-Säule (Sigma) gegeben und anschließend mit 500-2000 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8 gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 0.1 M Glycin-HCl, pH 3 in mehreren Fraktionen. In den Fraktionen wurde der Proteingehalt mit der BCA-Methode (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt und die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt vereinigt. Die Antikörper wurden gegen steriles PBS dialysiert (MWCO 100.000; Spectrapor, Roth, Karlsruhe) und anschließend sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Antikörperpräparation bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.6 Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode

Die Proteinkonzentration kann mittels der Bradford-Assays (Roti®-Quant, Carl Roth) bestimmt werden (Bradford, 1976). Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie in saurem pH durch die Triphenylmethan-Gruppe an nicht-polare Strukturen des Proteins und durch die Sulfonat-Gruppe an kationische Seitenketten von Proteinen. Die dadurch veränderte Absorption des Farbstoffs kann im Spektralphotometer gemessen werden.

2 µl Lysat wurde mit 1 ml Reaktionsreagenz (4:1, 250 mM Tris/HCl pH 7,8 : Bradford Reagenz) veretzt, gemischt und die Absorption im Spektralphotometer (Absorptionsmaximum: 595 nm) gemessen.

2.2.3.7 Bestimmung der Enzymaktivität von Caspasen

Die Bestimmung der Proteaseaktivitäten erfolgt mit Hilfe von fluorochromen Proteasesubstraten. Hierbei spalten enzymatisch aktive Caspasen ein spezifisches Peptid-Substrat, für Caspase-3 z-DEVD-AFC (7-Amino-4-trifluoromethyl-coumarin) und für Caspase-8 z-IETD-AFC und setzen so den Fluoreszenzfarbstoff AFC bzw. AMC frei. Die Menge an freigesetzten AFC pro Stunde ist ein direktes Maß für die enzymatische Aktivität von Caspasen bzw. Cathepsinen in einer Probe.

1×10^6 Zellen wurden nach Angaben stimuliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 5 min) geerntet, einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer für 15 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile und Kerne wurden durch Zentrifugation (11000 rpm, 4°C, 20 min) pelletiert. 50 µl des Lysatüberstands wurden mit 50 µl Caspase-Reaktionspuffer in einer lichtundurchlässigen 96-Lochplatte gemischt und für 30-90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde am Fluorometer (z-DEVD-AFC/z-IETD-AFC: Absorptionsmaximum: 405 nm, Emissionsmaximum: 535 nm) gemessen. Als Referenz diente eine Standardreihe mit freiem AFC (0; 0,5; 1; 2; 4 µM).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryontischer Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien (Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen etc.) der Firmen Renner (Dannstadt), Falcon (Becton Dickinson, San Jose, USA), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden) verwendet. Alle eukaryontischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 97 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Alle murinen Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % Zusatz von FBS, 1 % zugesetztem Sodium Pyruvat und 0,1 % β-Mercaptoethanol (alle Materialien von Gibco BRL, Karlsruhe) ohne Antibiotika kultiviert. Weitere verwendete Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

RPMI 1640 Medium ohne β-Mercaptoethanol : Jurkat

RPMI 1640 Medium mit 25 U/mL IL-2: primäre murine T-Zellen

DMEM Medium: 293-T

2.2.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität erfolgte nach Färbung mit Trypanblau. Diese Lösung dringt durch die zerstörte Zellmembran toter Zellen ein und färbt das Zytosol blau. Lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt und lassen sich so von den toten unterscheiden. Zur Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (1:10 in PBS verdünnt) gemischt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich durch folgende Formel:

Gezählte Zellen / Anzahl der gezählten Blöcke (16 kleine Kästchen) x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellen/ml

2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zelllinien wurden zu einer Zellzahl von 1×10^7 in einem Volumen von 1 ml in RPMI 1640-Medium bzw. DMEM-Medium mit 10 % DMSO aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst für 16 bis 24 h bei -80°C gelagert und dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

Die Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml warmem Medium (37°C) überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm (RT) wurden die Zellen sedimentiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen noch einmal mit Medium gewaschen, abzentrifugiert, in 10 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.3.4 Präparation primärer muriner Thymozyten

Die Mäuse wurden mittels Genickbruch getötet und die Extremitäten auf der Präparierunterlage festgesteckt. Die Maus wurde durch Hautschnitte vom Abdomen zum Hals und entlang der Extremitäten geöffnet und die Haut seitlich aufgespannt. Die Thymi und die Milz wurden mit einer gebogenen Pinzette unblutig aus dem Thorax bzw. dem Bauchraum entnommen. Anhängendes Binde- und Fettgewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die Organe wurden durch sterile $40\ \mu\text{m}$ Zellsiebe in sterile 50 ml-Reaktionsröhrchen mit RPMI 1640-Medium gedrückt. Die erhaltenden Zellsuspensionen wurden gewaschen (1500 rpm, 5 min, 4°C) und zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml sterilem 1x ACK-Puffer resuspendiert, welcher die Erythrozyten durch osmotischen Schock zum Platzen bringt. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur. Nach einmaligem Waschen der Zellen in RPMI 1640-Medium wurden die Thymozyten bzw. Splenozyten auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und bis zur weiteren Analyse in Zellkulturflaschen überführt. Für die weitere Aufreinigung der T-Zellen aus der Milz wurden die adhärenenten Zellen depletiert, indem die Zellsuspension für eine Stunde in einer liegenden 250 ml Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert wurde. Die adhärenenten Zellen haften an der Plastikoberfläche, wohingegen die nicht-adhärenenten Zellen weiterverwendet werden konnten. Die B-Zell-Depletion erfolgte durch eine Inkubation für zwei Stunden in einer Zellkulturflasche, die zuvor mit $10\ \mu\text{g/ml}$ Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper beschichtet wurde. Die B-Zellen binden an den Antikörper und

bleiben so an der Flaschenoberfläche haften. Die Reinheit der T-Zellen wurde mit einem anti-CD3 Antikörper mittels Durchflusszytometrie überprüft. Anschließend wurden die Zellen mit 5 µg/ml ConA für 18 h stimuliert. Danach wurden die T-Zellen dreimal mit Kulturmedium gewaschen, auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 25 U/ml IL-2 für weitere fünf Tage in Kultur gehalten.

2.2.2.5 Transfektion von Zellen

Lipofektion

In die murine thymische Lymphomzelllinie D wurden siRNA-Oligonukleotide mittels Lipofektion eingebracht. Zunächst wurden in RNase-freien Eppendorfgefäßen 90 µl RPMI 1640-Medium ohne FCS, 9 µl Transfektionsreagenz HiPerfect (Qiagen, Hilden) und jeweils 0,2 µg – 0,4 µg siRNA-Oligonucleotide gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. 2×10^5 Zellen wurden abzentrifugiert und in der oben beschriebenen Mischung aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl RPMI 1640-Medium + 10 % FCS. Nach einer Inkubation von 6 h im Brutschrank wurden 400 µl RPMI 1640-Medium + 10 % FCS zu dem Ansatz gegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation von 48-72 h.

2.2.3.6 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen (Durchflusszytometer)

Zur Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die resuspendierten Zellen für 20 min in je 50 µl einer entsprechenden Verdünnung des direkt gekoppelten Antikörpers (in PBS) bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen durch zweimalige Zugabe von 1 ml PBS, anschließende dreiminütige Zentrifugation bei 3500 rpm und Dekantieren des Überstandes gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die Proben in 200 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden in das Durchflusszytometer durch eine Kapillare eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge $\lambda = 488$ nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts war dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wurde von

Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe („forward scatter“, FSC), Granularität („side scatter“, SSC) oder Fluoreszenz („fluorescence detector“, FL) gaben.

2.2.3.7 Stimulation von Zellen

Um Zellen auf ihre Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber aktivierungsinduziertem Zelltodes zu untersuchen, wurde Zellen (1×10^5 Zellen/cm²) in 48-Lochplatten ausgesät. Die Stimulation des TZR wurde pharmakologisch nachgeahmt: der Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) führt zu starker Aktivierung der TZR-Effektorskinase Proteinkinase C (PKC), während die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch Zugabe des Ca²⁺-Ionophors Ionomycin simuliert wird. Die Stimulation erfolgte mit 0,1 µM PMA und 1 µM Ionomycin und der zeitgleichen Zugabe der verschiedenen Proteaseinhibitoren. Die Zellen wurden für 16 bis 48 h im Brutschrank inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Um die Signaltransduktionswege in Zellen nach TZR-Stimulation zu untersuchen, wurden 1 bis 5×10^6 Zellen in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und mit 1-10 µg anti-CD3 oder 0,1 µM PMA und 1 µM Ionomycin für verschiedene Zeiten in einem Reaktionsröhrchen bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch Inkubation der Zellen für 2 min auf Eis beendet und die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Lysepuffer.

2.2.3.8 Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderungen

Ein Kennzeichen der Apoptose sind morphologische Veränderungen der Zellen. Während des Apoptoseprozesses finden eine Veränderung der Membranorganisation und ein Zellmassenverlust durch Abschnürung apoptotischer Körperchen (Kerr et al., 1972) statt. Somit lassen sich apoptotische Zellen aufgrund ihrer geringen Größe, die sich in einem geringeren FSC-Signal äußert, von lebenden Zellen unterscheiden. Außerdem weisen apoptotische Zellen eine veränderte Organisation von Kern und Zytoplasma auf. Kondensiertes Zytoplasma wird aufgrund der erhöhten Granularität als vergrößertes SSC-Signal im Durchflusszytometer sichtbar.

Nach der Apoptoseinduktion im Brutschrank für 16–24 h wurden die Zellen im Durchflusszytometer durch Detektion des FSC/SSC analysiert. Das FSC-Signal wurde gegen das SSC-Signal aufgetragen und das Verhältnis der Populationen ober- und unterhalb der sich ergebenden Diagonalen bestimmt.

Spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet: $(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose}) \times 100$.

2.2.3.9 Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti

Mit Hilfe einer von Nicoletti *et al.* (1991) etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden (Nicoletti *et al.* 1991). Dazu wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 250 µl eines hypotonischen Fluorochrompuffers (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) für 12–72 h bei 4 °C unter Lichtabschluss lysiert. Die Lyse unter diesen Bedingungen ermöglicht die Diffusion gespaltener DNA-Fragmente aus dem Zellkern apoptotischer Zellen, während intakte DNA lebender Zellen vollständig im Kern verbleibt. Der Fluoreszenzfarbstoff dringt in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, so dass die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und den in Teilung befindlichen tetraploiden Zellkernen ließen sich daher im FL-2-Detektor des Durchflusszytometers die apoptotischen Zellkerne mit subdiploidem DNA-Gehalt quantifizieren. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet: $[(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose})] \times 100$.

2.2.3.10 Nachweis von DNA-Fragmentierung als „DNA-Leiter“

Dazu wurden jeweils 5×10^6 Zellen in 250 µl Lysepuffer (10mM Tris/HCl, pH 7,5, 10mM EDTA, 0,2 % TritonX-100) auf Eis für 10 min lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand für eine Phenol-Chloroform-Extraktion weiterverwendet. Zu dem Überstand wurde 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegeben, kurz gemischt und für 5 min bei 5000 rpm, RT zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt und die Phenol-Chloroform-Extraktion

wiederholt. Der wässrigen Phase wurde Natriumazetat zugegeben (Endkonzentration 0,3M), und die DNA wurde durch Zugabe von zwei Volumenanteilen Ethanol (100 %) präzipitiert. Die DNA wurde für 30 min bei 13000 rpm, 4°C pelletiert und das Pellet im Anschluss mit 70 %-igen Ethanol gewaschen. Darauffolgend wurden die Proben für 15 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugiert und das DNA-Pellet für 5-10 min bei RT getrocknet.

Das Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer, dem RNaseA zugesetzt war (25 µg/ml), gelöst und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte elektrophoretisch in einem analytischen 1,7 %-igen Agarosegel.

2.2.2.11 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials beruht auf membrangängigen kationischen Fluoreszenzfarbstoffen (JC-1, Rhodamine 123), die sich aufgrund des positiven mitochondrialen Transmembranpotentials spezifisch in Mitochondrien anreichern. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-terathylbenzimidazolylcarbocyaniniodid) bildet in hohen Konzentrationen Aggregate, sogenannte J-Aggregate, die bei 590 nm emittieren, wohingegen das monomere JC-1 bei 527 nm fluoresziert. Eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt demnach eine intakte, lebende Zelle an. Während der Apoptose bricht das mitochondriale Transmembranpotential zusammen, so dass sich die Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr in den Mitochondrien anreichern. Apoptotische Zellen zeigen daher gegenüber lebenden Zellen eine Abnahme in Fluoreszenz-2 (FL-2) und eine Zunahme in Fluoreszenz-1 (FL-1) im Durchflusszytometer. Der spezifische Verlust $\Delta\Psi_M$ wurde analog der in 2.3.5 beschriebenen Formel berechnet.

$0.5-1 \times 10^6$ Zellen wurden mit 5 µg/ml JC-1 (Stammlösung: 1 mg/ml in DMSO) versetzt und bei RT im Dunkeln für 20 min inkubiert. Danach wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert (3500 rpm, RT, 3 min) und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurden in 100 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert (FL-1 vs FL-2).

2.2.3.12 Messung von ROS

Mittels eines spezifischen Farbstoffes wurde die Generierung von Wasserstoffperoxid in der Zelle nachgewiesen. Die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration wurde durch 2',7-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Molecular Probes, USA) detektiert. Durch intrazelluläre Esterasen wird das nicht fluoreszierende 2',7-Dichlordihydrofluorescein (H_2DCF) gebildet, das zu 2',7-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert wird und fluoresziert. (Absorptionsmaximum: 504 nm, Emissionsmaximum: 529 nm)

$1-2 \times 10^5$ Zellen wurden mit 5 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ in 100 μl RPMI 1640-Medium ohne β -Mercaptoethanol für 20 min bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen (3500 rpm, 4°C, 3 min) und vorsichtig in 500 μl kaltem PBS resuspendiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer im FL-1-Detektor analysiert.

2.2.3.13 Ca^{2+} -Messung im Durchflusszytometer

Der Ca^{2+} -spezifische fluoreszierende Farbstoff Fluo4-AM (Molecular Probes, USA) wurde für die Ca^{2+} -Färbung verwendet. Die Modifikation von Carboxylsäuren mit Azetoxymethyl (AM) führt zu ungeladenen Molekülen, welche die Zytoplasmamembran durchdringen können.

Innerhalb der Zellen aktivieren Esterasen den Farbstoff durch Abspaltung von inhibitorischen lipophilen Gruppen. Wenn Ca^{2+} an den Farbstoff Fluo4-AM bindet, erhöht sich die Intensität seiner Fluoreszenz. Die Fluoreszenz wird am Durchflusszytometer gemessen (Fluo4-AM: Absorptionsmaximum: 494 nm, Emissionsmaximum: 504 nm)

1×10^6 Zellen wurden mit 1 μM Fluo4-AM bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (3500 rpm, RT, 3 min), zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Danach erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. Nach 1 min Messung wurden die Zellen mit anti-CD3 (30 $\mu\text{g/ml}$) oder mit anti-CD3 in Gegenwart eines kreuzvernetzenden Zweitantikörpers (20 ng/ml, Ziege, anti-Hamster IgG) stimuliert und das Ca^{2+} -Signal wurde für 7-10 min gemessen.

2.2.3.14 Immunfluoreszenz

Um Suspensionszellen auf Objektträgern färben zu können, wurden Zytospin-Präparate hergestellt. Pro Präparat wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt, gegebenenfalls stimuliert und einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese in 500 µl PBS resuspendiert, und 500 µl PFA wurde tropfenweise zugegeben. Die Zellen wurden 15 min bei RT inkubiert und im Anschluss einmal mit PBS gewaschen (5000 rpm, RT, 5 min). Die Zellen wurden in 500 µl 0,1% Triton X-100 in 1 % BSA/PBS-T resuspendiert, um sie zu permeabilisieren. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei RT, und die Zellen wurden einmal gewaschen (5000 rpm, RT, 5 min). Im nächsten Schritt wurden die Zellkerne der Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt. Hierzu wurden die Zellen in 500 µl Hoechst (2 µg/ml in PBS) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und einmal mit PBS gewaschen (5000 rpm, RT, 5 min). Die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-Cathepsin B, 1:200, anti-LAMP2, 1:200) erfolgte in 200 µl 1 % BSA/PBS-T für 2 h bei RT. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (5000 rpm, RT, 5 min). Die anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper (Esel, anti-Ziege, Alexa488, 1:500, anti-Kaninchen Cy3, 1:500) erfolgte in 200 µl 1 % BSA/PBS-T für 2 h bei RT. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (5000 rpm, RT, 5 min) und für den Zytospin in 100 µl PBS + 40% FCS resuspendiert. Die Proben wurden in die Trichter des Zytospinapparates gegeben und mit Filterpapierkarten und Objektträgern in die vorgesehene Halterung eingespannt. Die Proben wurden bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zytospin-Präparate wurden unter Lichtabschluss bei RT getrocknet, mit 30 µl Mowiol überschichtet, eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.3.15 *In vitro* anti-CD3 Stimulation

Thymozyten

Für die Stimulation wurden 48-Lochplatten vorbereitet. 10-30 µg/ml anti-CD3 wurden zusammen mit 50 µg/ml anti-CD28 in 200 µl sterilem PBS in die Löcher gegeben und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Lochplatten zweimal mit 500 µl sterilem PBS gewaschen und weiterverwendet. Die verwendeten Proteaseinhibitoren wurden zeitgleich mit den Thymozyten in die vorbereiteten 48-Lochplatten gegeben.

Die Thymozyten wurden mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ in die vorbereiteten 48-Lochplatten ausgesät und für 18-24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.16 Acridinorange-Färbung von Lysosomen

Acridinorange (AO) ist ein pH-sensitiver Farbstoff, der unter anderem für die Färbung von Lysosomen verwendet wird. Im sauren pH der Lysosomen (pH-Wert: ~ 5.0) aggregiert Acridinorange und emittiert oranges bis rotes Licht, während der Farbstoff bei neutralem pH (zytoplasmatischer pH-Wert: ~ 7.0) grün fluoresziert. Lysosomen weisen unter normalen Bedingungen einen sauren pH-Wert auf. Nach Permeabilisierung der lysosomalen Membran kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes und damit zu einem Farbumschlag von rot auf grün. Somit ermöglicht die pH-abhängige Fluoreszenz nicht nur eine Unterscheidung von Lysosomen von anderen Organellen und sondern kann auch zur Messung der lysosomalen Stabilität herangezogen werden.

$0,5-1 \times 10^6$ Zellen wurden nach Angaben stimuliert und einmal in PBS gewaschen (3500 rpm, RT, 3 min). Die Zellen wurden in 100 μ l Acridinorange-Lösung (5 μ g/ml) resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 1 ml RPMI-164 Medium gewaschen und in 200 μ l RPMI-164-Medium aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.17 Zellsortierung von Thymozyten-Subpopulationen

Thymozyten wurden wie unter 2.2.3.4 beschrieben präpariert. Es erfolgte zunächst eine Färbung aller Thymozyten mit CD8-PE (1:10 Verdünnung) in 100 μ l kaltem PBS in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Die Thymozyten wurden 20 min bei 4°C gefärbt und mit 50 ml kaltem, sterilem PBS gewaschen (1500 rpm, 4°C, 10 min). Anschließend wurden die Zellen mit CD8-PE (1:10 Verdünnung) in 100 μ l kaltem PBS für 20 min bei 4°C gefärbt und mit 50 ml kaltem, sterilem PBS gewaschen (1500 rpm, 4°C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 200 μ l PBS aufgenommen und durch einen Zellfilter gedrückt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Thymozytensuspension wurde auf 1 ml mit kaltem, sterilem PBS aufgefüllt und durchflusszytometrisch am FACSDiva- oder

FACSVantage-Zellsorter anhand der CD4- und CD8-Oberflächenexpression in CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺-Populationen sortiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Lymphomzelllinie D exprimiert T-Zelloberflächenmoleküle und stirbt nach Stimulation des TZR-Signalweges

Thymische Lymphome sind nicht-epitheliale Tumore aus dem Thymus und können in Mäusen spontan entstehen. Beim Mausstamm AKR/J ist die spontane Entstehung thymischer Lymphome bei Tieren im fortgeschrittenen Alter beschrieben. Diese thymischen Lymphome werden in AKR/J-Mäusen durch das Gross-Leukämie-Virus induziert (Cole, 1941; Gross, 1962). Aus thymischen Lymphomen können Zelllinien generiert werden, indem diese Tumore im Abstand von ein bis zwei Wochen durch serielle subkutane Injektion in syngene Mäuse passagiert werden. Anschließend werden Einzelzellsuspensionen aus den passagierten Tumoren hergestellt (Krammer et al., 1976). Da die Tumore im Thymus entstehen und phänotypisch Thymozyten ähneln, können diese Zelllinien als Modell für Thymozyten genutzt werden (Groves et al., 1995; Kovalik et al., 1996; Nishida et al., 2004; Schmitz et al., 2006).

Um die Apoptosemechanismen in Thymozyten *in vitro* zu untersuchen, wurde auf thymische Lymphomzelllinien zurückgegriffen, die bereits zu Beginn dieser Arbeit existierten (Krammer et al., 1976). Dabei sollte eine Zelllinie als Thymozytenmodell für die weitere Analyse identifiziert werden, die nicht CD95L-sensitiv ist, da CD95 bei der Apoptose im Thymus keine entscheidende Rolle spielt (Kotzin et al., 1988; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Newton et al., 1998; Page et al., 1998; Walsh et al., 1998). Insgesamt wurden 32 dieser Zelllinien analysiert, einen repräsentativen Überblick über die unterschiedlichen thymischen Lymphomzelllinien soll eine Auswahl von 14 Zelllinien geben (Tabelle 1). Diese thymischen Lymphomzelllinien wurden hinsichtlich verschiedener T-Zelloberflächenmoleküle wie der TZR β -Kette, der Korezeptoren CD4 und CD8 und des Todesrezeptors CD95 (Apo-1/Fas) untersucht. Die TZR β -Kette exprimierten acht von 14 untersuchten Zelllinien auf ihrer Zelloberfläche. Die Mehrzahl der getesteten Zelllinien exprimierten den CD4-Korezeptor (9/14) und nur zwei von 14 Zelllinien exprimierten zusätzlich den CD8-Korezeptor und waren somit doppelt-positiv.

Um die ausgewählten thymischen Lymphomzelllinien auf ihre Apoptosesensitivität hin zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit CD95L stimuliert und der Zelltod bestimmt (Tabelle 1, letzte Spalte). Darüber hinaus wurde die Expression von CD95 auf der Zelloberfläche bestimmt (Tabelle 1, Spalte 5). Es wurde deutlich, dass fast 80 % der Zelllinien (11/14) sensitiv für CD95L-vermittelte Apoptose waren, was mit der CD95-Expression auf der Zelloberfläche korrelierte. So war CD95 auf der thymischen Lymphomzelllinie 295 stark exprimiert, die sehr sensitiv gegenüber CD95L-induzierter Apoptose war (Tabelle 1, erste Zeile). Die CD95L-resistenten Zelllinien exprimierten kein CD95 auf der Zelloberfläche (Zelllinie 424, 439 und 303), mit Ausnahme der thymischen Lymphomzelllinie D. Diese war resistent gegenüber CD95L, obwohl CD95 auf der Zelloberfläche exprimiert wurde (Tabelle 1, untere Zeile).

Um TZR-vermittelten Zelltod in Thymozyten während ihrer Entwicklung *in vitro* untersuchen zu können, wurden die thymischen Lymphomzelllinien auf ihre Apoptosesensitivität gegenüber Stimulation mit einem monoklonalen Antikörper (Ak), der gegen CD3 gerichtet ist, getestet (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation mit diesem Ak induzierte lediglich in der Zelllinie 439 Zelltod. Neben der Ak-Stimulation wurden die thymischen Lymphomzelllinien mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in Kombination mit Ionomycin behandelt. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin ahmt ein TZR-Signal nach, indem Isoformen der Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden und es zu einem extrazellulären Einstrom von Kalzium kommt (Baier, 2003). PMA/Ionomycin induzierte nur in der thymischen Lymphomzelllinie D Zelltod (Abbildung 3.1 und Daten nicht gezeigt). Da ein *in vitro*-Modell für TZR-vermittelten Zelltod in Thymozyten etabliert werden sollte und die Nachahmung eines TZR-Signals mit PMA/Ionomycin in der thymischen Lymphomzelllinie D Zelltod auslöst, wurde diese Zelllinie für die weiteren Experimente in dieser Arbeit ausgewählt.

thymische Lymphomzelllinie	Oberflächenexpression				Sensitivität
	TZR β	CD4	CD8	CD95	LZ-CD95L
295	-	-	-	++	71 %
424	++	-	-	-	2 %
303	++	+/-	-	-	4 %
425	+/-	-	-	+/-	45 %
344	-	+	-	++	88 %
389	-	+	-	++	99 %
365	++	+	+	+	98 %
439	++	+/-	-	-	3 %
285	-	+/-	-	+	78 %
288	++	++	++	+/-	57 %
280	-	-	-	+/-	59 %
E20	+	-	-	+	99 %
308	-	++	-	+	93 %
D	+	+/-	-	+	16 %

Tabelle 1: Murine thymische Lymphomzelllinien exprimieren T-Zelloberflächenmoleküle und zeigen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber CD95L

Für die Analyse der Zelloberflächenrezeptoren wurden die Zellen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die TZR β -Kette, gegen CD4, gegen CD8 oder gegen CD95 (Jo2) gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen. Die Bestimmung der Apoptosesensitivität erfolgte durch Stimulation der Zellen mit dem Leuzin-Zipper-CD95 Liganden (LZ-CD95L). Exemplarisch ist der Anteil toter Zellen nach Stimulation mit 20 ng/ml LZ-CD95L für 20 h gezeigt.

++ = hohe Expression; + = mittlere Expression; +/- = niedrige Expression; % = Prozent spezifischer Zelltod

Die thymische Lymphomzelllinie D exprimiert die β -Kette des TZR (Abb. 3.1A, oberes Histogramm). Der CD4-Korezeptor zeigte eine schwache Expression, der Korezeptor CD8 hingegen wurde nicht exprimiert (Abb. 3.1A, mittlere Histogramme). Die Zellen wiesen eine deutliche Expression von CD95 auf (Abb. 3.1A, unteres Histogramm). Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinie D wurde aktivierungsinduzierter Zelltod im Vergleich zu CD95L-vermitteltem Zelltod in einer Stimulationskinetik untersucht. Nach Stimulation mit LZ-CD95L zeigte sich ein spezifischer Zelltod von bis zu 20 %, der nach zwölf Stunden Stimulation sein Maximum erreichte (Abb. 3.1B, gestrichelte Linie). Obwohl die Zelllinie D den TZR auf ihrer Zelloberfläche exprimierte, war sie resistent gegenüber der Stimulation mit einem gegen CD3 gerichteten Ak. Daher wurde TZR-vermittelter Zelltod in dieser Zelllinie mit PMA und Ionomycin nachgestellt. Die Stimulationskinetik mit PMA/Ionomycin zeigte einen stetigen Anstieg des aktivierungsinduzierten Zelltodes über einen Zeitraum von 45 Stunden. Nach

45 Stunden Stimulation waren über 80 % der Zellen tot (Abb. 3.1B, durchgezogene Linie).

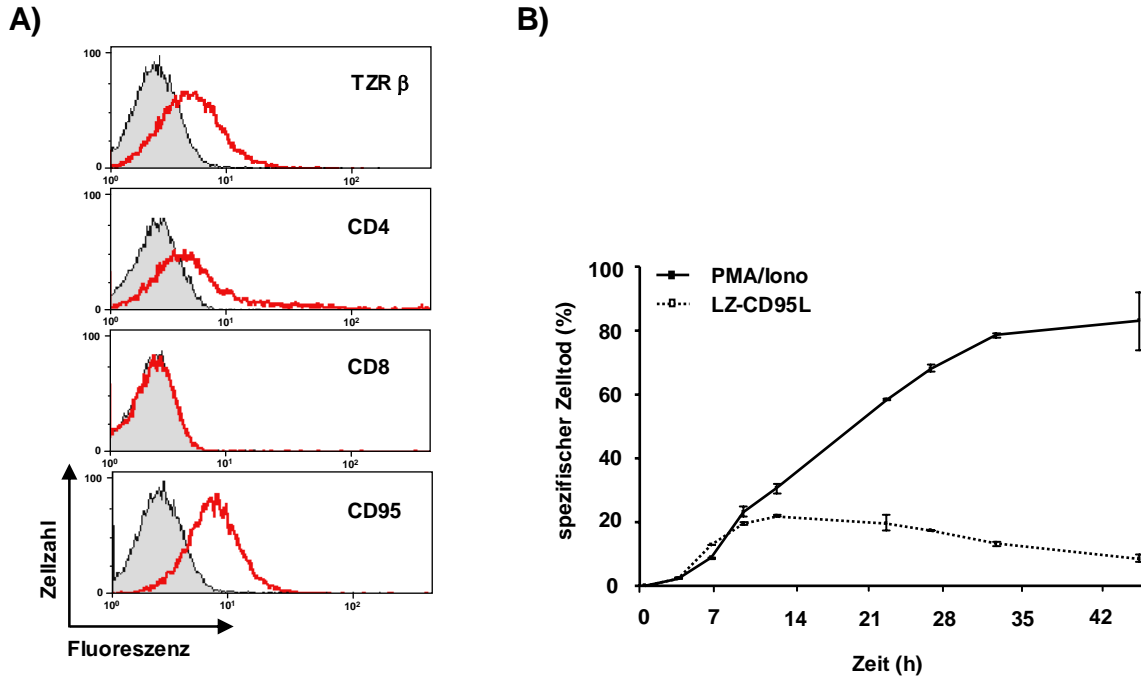


Abbildung 3.1: Die murine thymische Lymphomzelllinie D exprimiert TZR-Oberflächenmoleküle, ist CD95L-resistent und stirbt nach PMA/Ionomycin-Stimulation

A) Expression von T-Zelloberflächenmolekülen: 3×10^5 Zellen der Zelllinie D wurden mit Fluorophor-gekoppelten Ak gegen die TZR β -Kette, CD4, CD8 und CD95 gefärbt, und die Expression wurde im Durchflusszytometer bestimmt (rote Kurve). Als Kontrolle wurden entsprechende fluoreszenzmarkierte Isotyp-Kontrollen verwendet. Die Isotyp-Kontrolle ist als graue, gefüllte Kurve dargestellt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von vier Experimenten. (n=4)

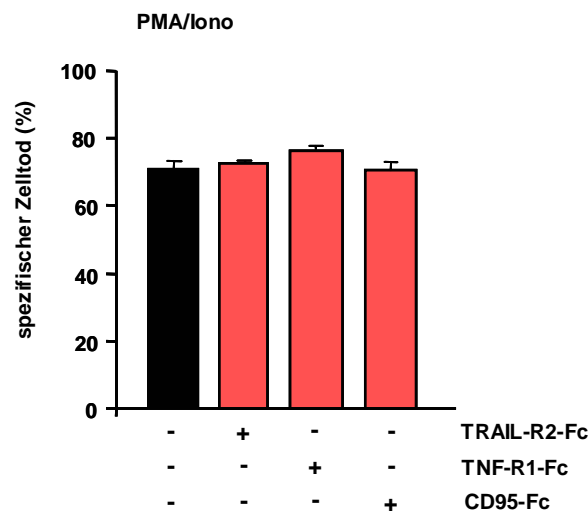
B) Apoptosesensitivität gegenüber LZ-CD95L und PMA/Ionomycin: Die Zelllinie D wurden in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und mit LZ-CD95L (20 ng/ml) oder PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Nach drei bis 45 h wurde der Prozentsatz der toten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. (n = 3)

Diese Daten zeigen, dass die thymische Lymphomzelllinie D wichtige T-Zelloberflächenmoleküle exprimiert. Sie weist eine geringe Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose auf. TZR-vermittelter Zelltod kann in diesen Zellen durch PMA/Ionomycin nachgestellt werden. Die Kinetik zeigt, dass dieser aktivierungsinduzierte Zelltod nach 7 h deutlich ansteigt und sich über die Zeit verstärkt. Somit stellt die thymische Lymphomzelllinie D ein geeignetes Modell für TZR-vermittelten Zelltod in Thymozyten dar.

3.2 Der aktivierungsinduzierte Zelltod der thymischen Lymphomzelllinie D ist unabhängig von den Todesrezeptoren CD95, TRAIL-R2 und TNF-R1

Die *in vitro*-Stimulation von aktivierten T-Zellen oder T-Zelllinien über ihren TZR kann Todesrezeptor-abhängige Apoptose (zum Beispiel CD95) induzieren. Um auszuschließen, dass der aktivierungsinduzierte Zelltod der Zelllinie D über Todesrezeptoren verläuft, wurden Fc(Ig)-Fusionsproteine der Todesrezeptoren TRAIL-R2, TNF-R1 und CD95 verwendet. Der Fc-Teil eines Antikörpers (engl.: *fragment crystallizable*) besteht aus den C-terminalen Hälften der beiden schweren Antikörperketten und besitzt keine antigenbindenden Eigenschaften. Die Fusion von CD95 mit dem Fc-Teil eines Antikörpers resultiert in einem rekombinanten Protein, das Scheinrezeptor-ähnliche Eigenschaften besitzt. Wird das CD95-Fc(Ig)-Fusionsprotein (CD95-Fc) im Überschuß zu Zellen gegeben, blockiert es die Aktivierung von CD95 auf der Zelloberfläche, indem es CD95L kompetitiv bindet. Dadurch wird die Bindung des Liganden an CD95 verhindert und so die Signalleitung von CD95 blockiert. Im vorliegenden Experiment (Abb. 3.2) wurde die Zelllinie D mit PMA/Ionomycin stimuliert und zeitgleich mit CD95-Fc, TRAIL-R2-Fc oder TNF-R1-Fc inkubiert. Der Prozentsatz der toten Zellen wurde nach 18 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod in Abb. 3.2A dargestellt. Der aktivierungsinduzierte Zelltod konnte weder durch CD95-Fc noch durch TRAIL-R2-Fc oder TNF-R1-Fc vermindert werden. Als Positivkontrollen wurden TRAIL-sensitive humane Jurkat T-Zellen, die CD95-sensitive murine thymische Lymphomzelllinie 308 und die TNF-sensitive, murine T-Zelllinie DC27.1 verwendet. In Jurkat T-Zellen wurde der TRAIL-induzierte Zelltod durch Zugabe von TRAIL-R2-Fc fast vollständig verhindert (Abb. 3.2B). Die Zugabe von CD95-Fc zur Zelllinie 308 konnte CD95-induzierten Zelltod ebenfalls vollständig blockieren. Eine ähnlich starke Inhibition konnte durch TNF-R1-Fc in TNF-stimulierten DC27.1 T-Zellen erzielt werden. Die Wirksamkeit der verwendeten Todesrezeptor-Fc(Ig)-Fusionsproteine wurde somit belegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der aktivierungsinduzierte Zelltod in der Zelllinie D unabhängig von den Todesrezeptoren CD95, TRAIL-R2 und TNF-R1 verläuft.

A)



B)

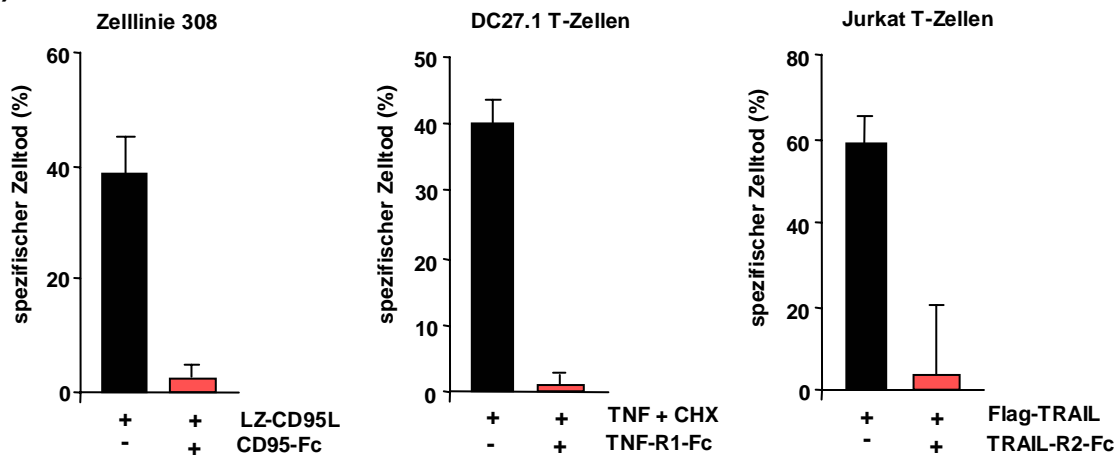


Abbildung 3.2: Der aktivierungsinduzierte Zelltod kann nicht durch Fc(Ig)-Fusionsproteine von CD95, TRAIL-R2 und TNF-R1 blockiert werden

A) Einfluss der Fc(Ig)-Fusionsproteine CD95-Fc, TRAIL-R2-Fc und TNF-R1-Fc auf aktivierungsinduzierten Zelltod der Zelllinie D: Zellen wurden in 48-Lochplatten (1×10^5 Zellen/cm²) ausgesät und mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Die Fc(Ig)-Fusionsproteine CD95-Fc, TRAIL-R2-Fc oder TNF-R1-Fc wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben. Nach 15 h wurde der Zelltod durchflusszytometrisch bestimmt und der spezifische Zelltod berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten. (n = 2)

B) Die Fc(Ig)-Fusionsproteine CD95-Fc, TRAIL-R2-Fc und TNFR1-Fc inhibieren CD95-, TRAIL- und TNF-induzierte Apoptose: Die verwendeten Zellen wurden in 48-Lochplatten ausgesät. Die Zugabe der einzelnen Fc(Ig)-Fusionsproteine in einer Konzentration von 10 μ g/ml erfolgte 30 min vor der Stimulation der Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit Flag-TRAIL (400 ng/ml) stimuliert. Zellen der thymischen Lymphomzelllinie 308 wurden mit LZ-CD95L (20 ng/ml) stimuliert. DC27.1 T-Zellen wurden mit Cyclohexamid (CHX, 1 μ g/ml) und TNF (1 nM) behandelt. Der Zelltod wurde in allen experimentellen Ansätzen nach 15 h durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten. (n = 2)

3.3 Im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes der thymischen Lymphomzelllinie D werden Caspasen prozessiert und aktiviert

Ein Schlüsselereignis während der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen. Ihre Aktivierung erfolgt durch Prozessierung und Heterotetramerisierung. Caspasen spalten Polypeptide nach einer Erkennungssequenz von vier Aminosäuren mit einem Aspartat in Position P1. Um zu überprüfen, welche Caspasen im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes der Zelllinie D prozessiert werden, wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit PMA/Ionomyzin stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. Bereits vier Stunden nach Stimulation mit PMA/Ionomyzin konnten p43/41 und die p18-Untereinheit der Initiatorcaspase-8 detektiert werden (Abb. 3.3A, obere beide Reihen). Zu diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls eine schwache Caspase-9-Prozessierung beobachtet. Auch die p17-Untereinheit der Effektorcaspase-3 ließ sich nach vier Stunden Stimulation im Western Blot nachweisen (Abb. 3.3A, mittlere und untere Reihe). Zusätzlich zur Analyse der Caspaseprozessierung im Western Blot wurde die Caspaseaktivität exemplarisch für Caspase-3 mit Hilfe des spezifischen fluorogenen Caspase-3-Substrates z-DEVD-AFC bestimmt. Die Stimulation mit PMA/Ionomyzin induzierte in der Zelllinie D innerhalb von vier Stunden eine deutlich messbare Caspase-3-Aktivität (Abb. 3.3B). Nach sechs Stunden konnte eine weitere Zunahme der Aktivität nachgewiesen werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass es im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes in der Zelllinie D zu einer Prozessierung und Aktivierung von Initiator- als auch von Effektorcaspasen kommt.

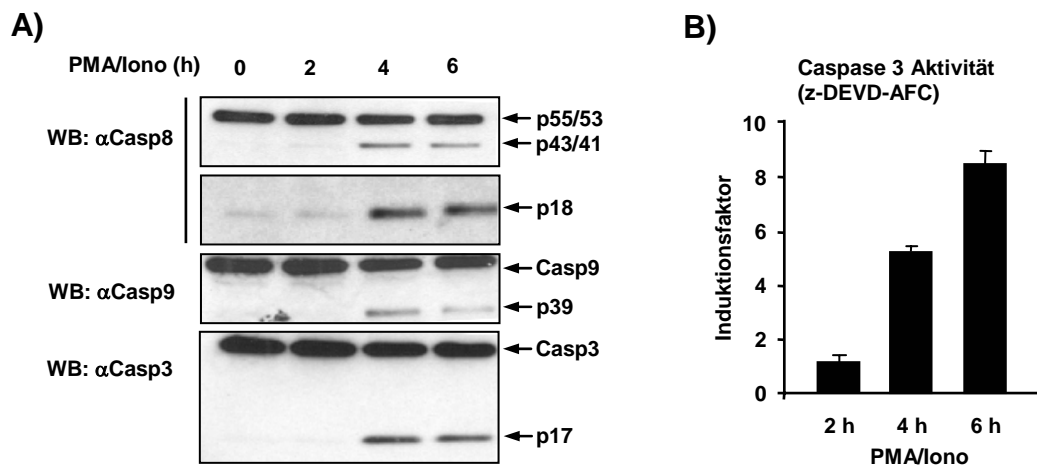


Abbildung 3.3.: Caspaseprozessierung und -aktivierung im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes in der Zelllinie D

A) Western Blot-Analyse der Caspaseprozessierung: Zellen der Zelllinie D wurden in 6-Lochplatten (1×10^5 Zellen/cm²) ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgten der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen und der immunochemische Nachweis der verschiedenen Caspasen im Western Blot.

B) Aktivitätsmessung von Caspase-3: Zellen der Zelllinie D wurden in 6-Lochplatten (1×10^5 Zellen/cm²) ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität wurde mit einem spezifischen, fluorogenen Caspase-3-Substrat (z-DEVD-AFC) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. (n = 4)

3.4 Der aktivierungsinduzierte Zelltod der Zelllinie D kann nicht durch Caspaseinhibition verhindert werden

Caspasen sind Schlüsselmoleküle bei der Apoptose, und die meisten bisher bekannten Formen von programmiertem Zelltod sind von Caspasen abhängig. Um die Caspaseabhängigkeit des aktivierungsinduzierten Zelltodes der Zelllinie D zu untersuchen, wurde der Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon) verwendet. Bei diesem sehr häufig verwendeten Caspaseinhibitor handelt es sich um ein Peptidtrimer mit einer Chlormethylketongruppe, welche die irreversible Bindung an das aktive Zentrum von Caspasen erlaubt (Ekert et al., 1999). Zunächst wurde die Zelllinie D mit unterschiedlichen Konzentrationen des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk vorinkubiert und nach einer Stunde mit PMA/Ionomycin stimuliert. Nach 18 Stunden wurde durchflusszytometrisch der Zelltod bestimmt. Selbst eine hohe Konzentration des

Caspaseinhibitors bewirkte nur eine minimale Verminderung des aktivierungsinduzierten Zelltodes (Abb. 3.4A). Z-VAD-fmk-Konzentrationen über 50 μM zeigten in diesen Experimenten leicht toxische Effekte und werden aus diesem Grund nicht dargestellt. Weiterhin wurde überprüft, ob die Inhibition von Caspasen den Phänotyp des Zelltodes ändert. So ist bekannt, dass die Hemmung der apoptotischen Signalkaskade Nekrose auslösen kann. Ein prominentes Merkmal apoptotischer Zellen sind Zellkerne mit geringerem DNA-Gehalt. Um den Phänotyp des Zelltodes zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt von Zellen der Linie D acht Stunden nach PMA/Ionomycin-Stimulation bestimmt und im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 3.4B). Nach 18 Stunden wies ein deutlicher Anteil der PMA/Ionomycin-stimulierten Zellen Zellkerne mit vermindertem DNA-Gehalt auf. Die Inhibition von Caspasen mit z-VAD-fmk verringerte den Anteil apoptotischer Zellkerne nicht.

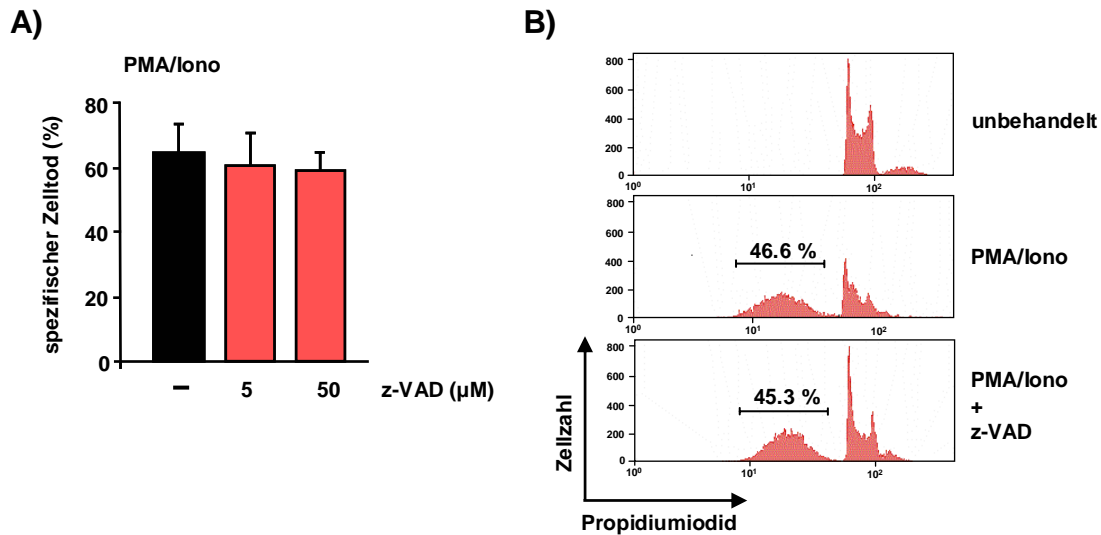


Abbildung 3.4.: Der Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk verhindert den aktivierungsinduzierten Zelltod nicht

A) Hemmungsexperiment mit z-VAD-fmk: Zellen der Zelllinie D wurden in 48-Lochplatten (1×10^5 Zellen/ cm^2) ausgesät und für 60 min mit z-VAD-fmk (z-VAD, 5 bzw. 50 μM) vorbehandelt. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μM). Nach 18 h wurde der Zelltod durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten. (n = 3)

B) Propidiumiodid-Färbung nach der Nicoletti-Methode: 5×10^5 Zellen der Zelllinie D wurden in 12-Lochplatten für 18 h in An- oder Abwesenheit von z-VAD-fmk (z-VAD, 50 μM) wie unter A) stimuliert, anschließend mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist eine repräsentative Färbung aus drei Experimenten. (n = 3)

Diese Daten zeigen, dass der aktivierungsinduzierte Zelltod in der Zelllinie D apoptotische Merkmale besitzt und dass die Inhibition von Caspasen den Phänotyp des Zelltodes nicht verändert.

3.5 Der Caspase-unabhängige Zelltod nach PMA/Ionomyzin-Stimulation zeigt apoptotische Merkmale

Neben dem verminderten DNA-Gehalt apoptotischer Zellkerne gibt es weitere morphologische und molekulare Merkmale der Apoptose. Dazu zählt die frühe Exposition des Membranlipids PS auf der Oberfläche apoptotischer Zellen und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Die Externalisierung von PS findet noch vor dem Verlust der Membranintegrität statt, der mit dem in die Zelle eindringenden Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD detektiert werden kann. Um zu klären, ob PS auf der Oberfläche sterbender Zellen der Linie D exponiert wird, wurden Zellen sechs Stunden nach PMA/Ionomyzin-Stimulation mit Fluorophor-gekoppelten Annexin V und dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD gefärbt und der Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V-positiv, 7-AAD-negativ) durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.5A). Die Daten in Abb. 3.5A zeigen, dass PS auf sterbenden Zellen der Zelllinie D exponiert wurde. Während bei fast 20 % der PMA/Ionomyzin-stimulierten Zellen PS auf der Zelloberfläche detektiert wurde, hatte ein Großteil der Zellen bereits ihre Membranintegrität verloren und war 7-AAD-positiv. Des Weiteren wurde die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials in der Zelllinie D gemessen. Dazu wurden Zellen für ein bis neun Stunden mit PMA/Ionomyzin stimuliert, mit dem membrangängigen kationischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 gefärbt und der Verlust des Membranpotentials anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.5B). Der Anteil der Zellen mit depolarisiertem mitochondrialem Membranpotential nahm über sechs Stunden zu. Nach sechs Stunden PMA/Ionomyzin-Stimulation zeigten etwa 25 % der behandelten Zellen eine signifikante Depolarisierung der Mitochondrien. Ein Charakteristikum von apoptotischem Zelltod ist die Degradierung der DNA in 200 bp-lange Fragmente, was sich in einer Elektrophorese als typische „DNA-Leiter“ darstellt. In der Zelllinie D konnte nachgewiesen werden, dass nach 16 Stunden PMA/Ionomyzin-Stimulation die DNA degradiert wird und sich ein typisches Muster von etwa 200 bp-langen DNA-Fragmenten nach Elektrophorese zeigt (Abb. 3.5C). Diese Ergebnisse und die Daten aus Abb.3.4B demonstrieren, dass

sterbende Zellen der Zelllinie D nach PMA/Ionomycin-Stimulation früh- und spätapoptotische Merkmale aufweisen. Somit zeigt der aktivierungsinduzierte Zelltod in der Zelllinie D einen apoptotischen Phänotyp.

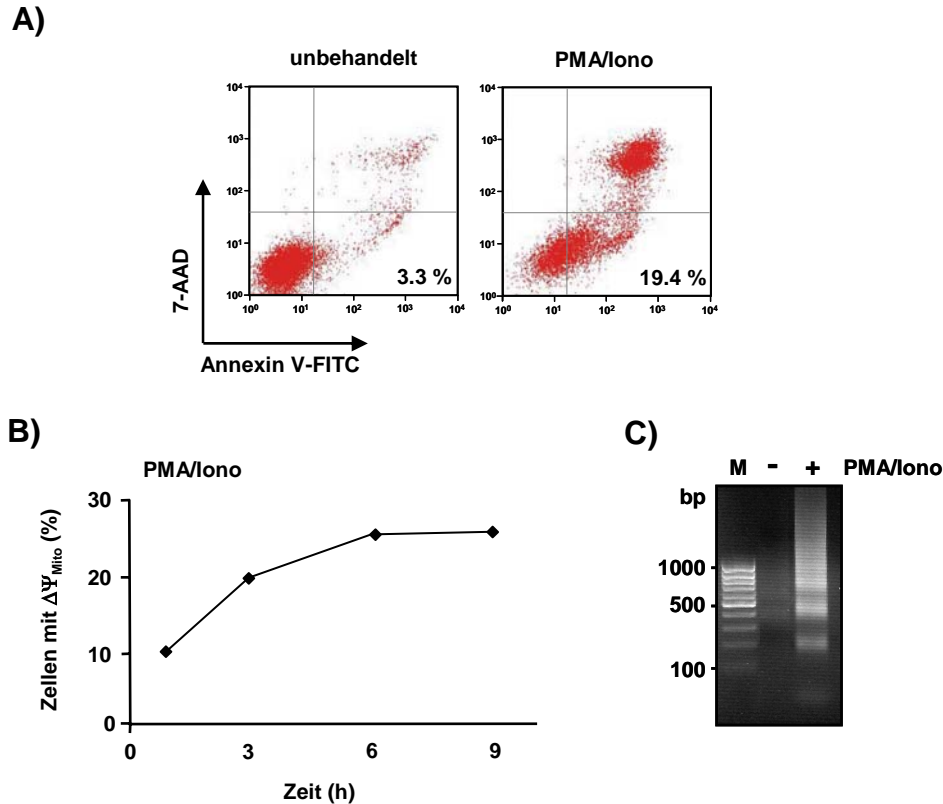


Abbildung 3.5: Externalisierung von PS, Depolarisierung der Mitochondrien und DNA-Fragmentierung in der Zelllinie D

A) Oberflächenfärbung von PS mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V auf der Zelllinie D: Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und für 6 h mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit FITC-gekoppelten Annexin V und 7-AAD gefärbt und der Anteil frühapoptotischer (Annexin V-positiv, 7-AAD-negativ) Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten. (n = 3)

B) Messung des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials (Ψ_{Mito}) mittels JC-1-Färbung in der Zelllinie D: Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und wie unter A) beschrieben stimuliert. Im Anschluss erfolgten die Färbung der Zellen mit JC-1 und die durchflusszytometrische Analyse. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei Experimenten. (n = 2)

C) Nachweis der DNA-Fragmentierung als „DNA-Leiter“ in der Zelllinie D: 5×10^6 Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und für 16 h mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) stimuliert. Die isolierte DNA wurde in einem 1,7%igen Agarosegel zusammen mit einem DNA-Standard (M, 100bp DNA ladder) aufgetrennt.

3.6 Die lysosomale Protease Cathepsin B vermittelt den Caspase-unabhängigen Zelltod in der Zelllinie D

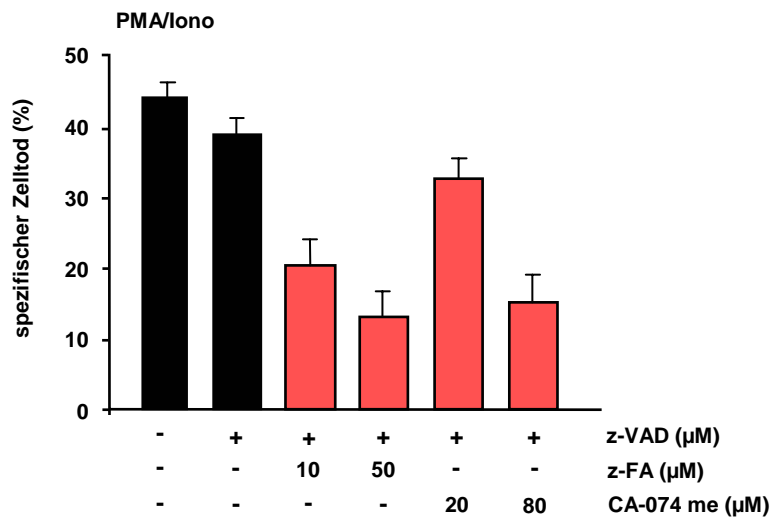
In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Caspase-unabhängiger Zelltod von anderen Proteasen als Caspasen vermittelt werden kann (Johnson, 2000). Zu diesen Proteasen zählen unter anderem die lysosomalen Cathepsine (Leist und Jaattela, 2001b; Wang, 2000). Um den Einfluss von Cathepsinen auf den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D zu überprüfen, wurde der durch PMA/Ionomyzin induzierte Zelltod durch den Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk (Benzyloxycarbonyl-Phe-Ala-fluormethylketon) (Smith et al., 1988) und die methylierte Form des Cathepsin B-Inhibitors CA-074 (*L-trans*-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH-propylamid) inhibiert. Der Oligopeptidinhibitor z-FA-fmk blockiert die proteolytische Aktivität von Cathepsin B durch die irreversible Alkylierung des Cysteinrestes im katalytischen Zentrum der Protease. Allerdings inhibiert er aufgrund überlappender Substratspezifität auch Cathepsin L. Der Oligopeptidinhibitor CA-074-me ist ein Cathepsin B-spezifischer Inhibitor (Buttle et al., 1992).

Die Zelllinie D wurde mit PMA/Ionomyzin stimuliert, und zeitgleich wurden die verschiedenen Proteaseinhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk behandelt. Der aktivierungsinduzierte Zelltod konnte weder durch den Cathepsin B/L-spezifischen Inhibitor z-FA-fmk noch durch den Cathepsin B-spezifischen Inhibitor CA-074-me alleine verhindert werden (Abb. 3.6B). Die zusätzliche Inhibition der Caspaseaktivität mit z-VAD-fmk konnte jedoch den aktivierungsinduzierten Zelltod der Zelllinie D deutlich vermindern (Abb. 3.6A). Die Inhibition des Caspase-unabhängigen Zelltodes durch die Cathepsininhibitoren war konzentrationsabhängig (Abb. 3.6A, rote Balken) und konnte sowohl für den Cathepsin B/L-spezifischen Inhibitor z-FA-fmk als auch für den Cathepsin B-Inhibitor CA-074-me gezeigt werden. Da die alleinige Hemmung von Caspasen oder von Cathepsin B/L den aktivierungsinduzierten Zelltod nicht vermindert, lässt sich vermuten, dass die Proteasen unabhängig voneinander Zelltod auslösen und sich gegenseitig kompensieren.

Diese Daten deuten darauf hin, dass der aktivierungsinduzierte Zelltod der Zelllinie D über zwei Signalwege verläuft, die sich in ihrer Caspase-Abhängigkeit unterscheiden. Die Caspaseprozessierung und -aktivierung kann zwar durch den Caspaseinhibitor

z-VAD-fmk inhibiert werden (Daten nicht gezeigt), jedoch zeigen die Experimente, dass die Zelllinie D auch ohne Caspasebeteiligung stirbt. Dieser Caspase-unabhängige Zelltod wird durch die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B vermittelt. Da der Oligopeptidinhibitor z-FA-fmk neben Cathepsin B auch Cathepsin L inhibiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cathepsin L ebenfalls am Caspase-unabhängigen Zelltod in der Zelllinie D beteiligt ist.

A)



B)

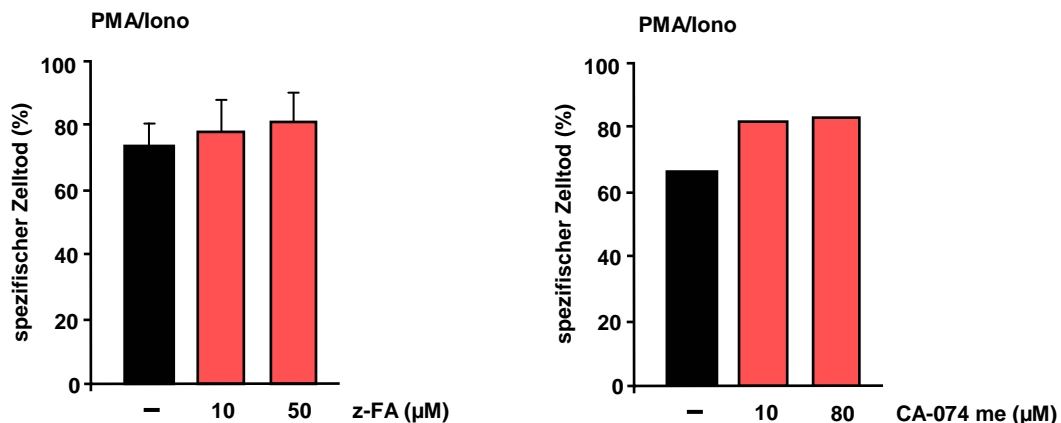


Abbildung 3.6: Der Caspase-unabhängige Zelltod der Zelllinie D wird durch Cathepsin B- bzw. Cathepsin B/L-spezifische Peptidinhibitoren verhindert

A) Gleichzeitige Inhibition von Caspasen und Cathepsin B bzw. Cathepsin B/L vermindert konzentrationsabhängig den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D: Zellen wurden in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 µM) stimuliert. Zeitgleich wurden der Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (z-VAD, 50 µM) zusammen mit dem Cathepsin B/L-

Inhibitor z-FA-fmk (z-FA) oder dem Cathepsin B-Inhibitor CA-074-me in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Nach 18 h wurde der Prozentsatz der sterbenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus sieben Experimenten. (n=7)

B) Alleinige Inhibition der lysosomalen Cathepsine B bzw. B/L hat keinen Einfluss auf den aktivierungsinduzierten Zelltod der Zelllinie D: Zellen wurden in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und wie unter A) beschrieben stimuliert. Zeitgleich wurde entweder der Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk (zFA) oder der Cathepsin B-Inhibitor CA-074-me zugegeben. Nach 18 h wurde der Prozentsatz der sterbenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten (n=3) (links) und ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten, (n=3) (rechts).

Um herauszufinden, ob der Caspase-unabhängige Zelltod ausschließlich von Cathepsin B vermittelt wird und um die essentielle Rolle von Cathepsinen in der thymischen Lymphomzelllinie D zu unterstreichen, wurden Experimente mit Cathepsin B-spezifischer siRNA durchgeführt. Dazu wurde die Expression von Cathepsin B in der Zelllinie D mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Cathepsin B-spezifische oder Kontroll-siRNA-Oligonukleotide wurden durch Lipofektion in die Zelllinie D eingebracht. Die Reduktion des Cathepsin B-Expressionsniveaus wurde nach 72 Stunden mittels Western Blot überprüft (Abb. 3.7A). Von den verwendeten Cathepsin B-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden regulierte das Oligonukleotid #3 (CatB#3) die Expression von Cathepsin B im Vergleich zu dem Kontroll-siRNA-Oligonukleotid (Ctr) deutlich herunter, während das Oligonukleotid #2 (CatB#2) das Expressionsniveau nicht beeinflusste (Abb. 3.7A). Die transfizierten Zellen wurden 72 Stunden nach der Lipofektion mit PMA/Ionomycin in An- oder Abwesenheit des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk stimuliert, und der Zelltod wurde nach 14 Stunden durchflusszytometrisch analysiert. Der aktivierungsinduzierte Zelltod konnte unabhängig davon, ob die Zellen mit Cathepsin B-spezifischen oder Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden transfiziert worden waren, induziert werden (Abb 3.7B, schwarze Balken). Zellen, in denen das Cathepsin B-Expressionsniveau nicht herunterreguliert war (Ctr und CatB#2), starben nach PMA/Ionomycin-Stimulation auch in Anwesenheit des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk. Die deutliche Verminderung der Cathepsin B-Expression durch das Oligonukleotid #3 (CatB#3) hatte zur Folge, dass der Caspaseinhibitor z-VAD-fmk den aktivierungsinduzierten Zelltod vollständig blockieren konnte. Diese vollständige Blockade des aktivierungsinduzierten Zelltodes wurde in Hemmungsexperimenten mit den verschiedenen Proteaseinhibitoren nicht erreicht. Ein möglicher Grund könnte die geringe Toxizität der Cathepsin B/L-Inhibitoren in höheren Konzentrationen sein.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Caspase-unabhängige Zelltod (spezifischer Zelltod in Anwesenheit von Caspaseinhibitoren) durch die Herunterregulation der Cathepsin B-Expression verhindert werden kann und belegen, dass Cathepsin B den Caspase-unabhängigen Zelltod in der thymischen Lymphomzelllinie D vermittelt.

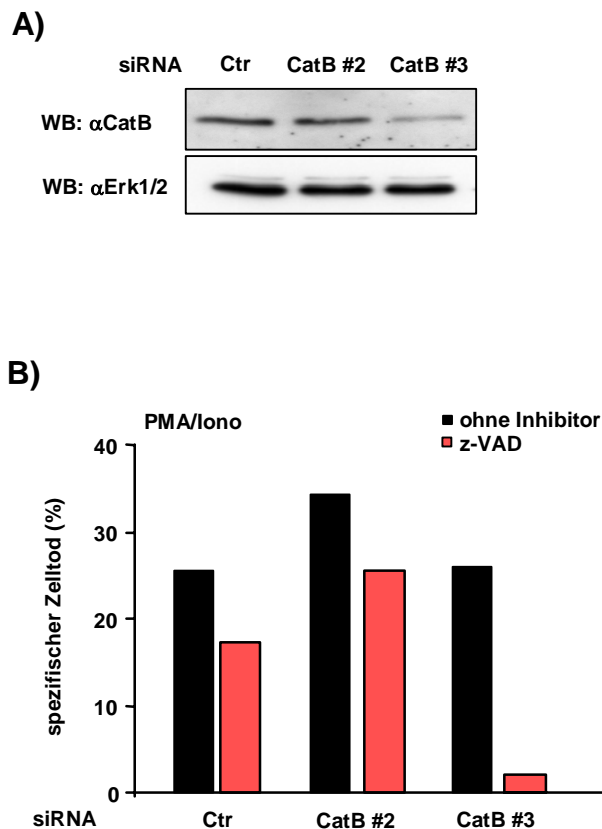


Abbildung 3.7: Cathepsin B ist essentiell für den Caspase-unabhängigen Zelltod in der thymischen Lymphomzelllinie D

A) Herunterregulation der Cathepsin B-Expression durch RNA-Interferenz in der Zelllinie D: 3×10^5 Zellen der wurden transient über Lipofektion mit Cathepsin B spezifischen (CatB#2 oder CatB#3) oder Kontroll-siRNA- Oligonukleotiden (Ctr) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 72 h im Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die spezifische Herunterregulation des Cathepsin B-Expressionsniveaus wurde mittels Western Blot durch einen polyklonalen anti-Cathepsin B Ak (α CatB) verifiziert. Als Ladekontrolle dient ERK1/2 (α -Erk1/2).

B) Zellen wie unter A) beschrieben transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 72 h im Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) für 14 h stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Anwesenheit (rote Balken) oder in Abwesenheit (schwarze Balken) des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk (z-VAD, 50 μ M). Der Prozentsatz sterbender Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten. (n = 3)

3.7 PMA/Ionomycin-Stimulation bewirkt LMP und eine veränderte zelluläre Lokalisation von Cathepsin B

LMP führt zur Freisetzung von lysosmalen Cathepsinen in das Zytosol und ist im Zusammenhang mit Caspase-unabhängigen und Caspase-abhängigen Zelltod beschrieben (Brunk et al., 2001; Kroemer und Jaattela, 2005). In der Mehrzahl der Studien wurde LMP mit Hilfe des pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffs Acridinorange

analysiert. Dabei werden die pH-Unterschiede zwischen Zytosol und Lysosomen genutzt. Acridinorange akkumuliert in sauren Organellen, wie beispielsweise den Lysosomen. Wird der Farbstoff aus den Lysosomen freigesetzt, ändert sich dessen Emissionsspektrum aufgrund der pH-Unterschiede zwischen Lysosomen und Zytosol, und die Signalintensität nimmt ab.

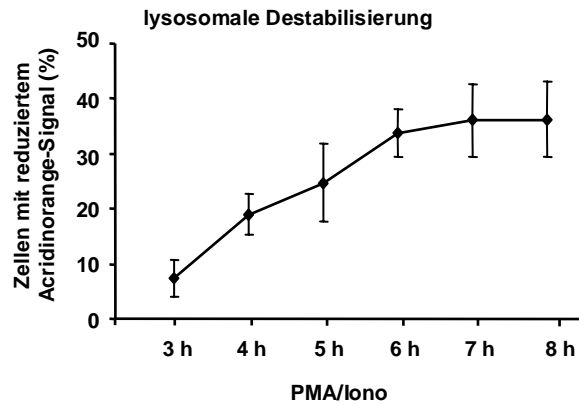
Um zu überprüfen, ob die Lysosomen im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes in der Zelllinie D permeabilisiert werden, wurden Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert und nach unterschiedlichen Zeiten mit Acridinorange gefärbt. Als Referenz dienten unstimulierte, Acridinorange-gefärbte Zellen. Die Analyse der Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde bezogen auf die Fluoreszenz unstimulierter Zellen berechnet und in Abbildung 3.8A als Anteil Zellen mit reduziertem Acridinorange-Signal dargestellt. LMP zeigte sich bereits drei Stunden nach Stimulation des TZR-Signalweges mit PMA/Ionomycin. Der Anteil an permeabilisierten Lysosomen nahm über die Zeit zu. Nach sieben bis acht Stunden wurde ein Plateau erreicht. Um auszuschließen, dass es sich bei LMP um einen indirekten Prozess im Laufe der apoptotischen Veränderungen in der Zelle handelt, wurde die Analyse ausschließlich auf frühapoptotische Zellen beschränkt, die anhand ihres FSC/SSC-Signales im Durchflusszytometer von spätapoptotischen Zellen getrennt werden können. Die Daten zeigen, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Stimulation mit PMA/Ionomycin die Lysosomen permeabilisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass LMP ein zeitiges Ereignis während des aktivierungsinduzierten Zelltodes und eine Voraussetzung für den Austritt von Cathepsin B ist.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Cathepsin B nach PMA/Ionomycin-Stimulation aus den Lysosomen freigesetzt wird und somit seine zelluläre Lokalisation ändert. Hierzu wurde die zelluläre Verteilung von Cathepsin B mittels Fluoreszenzmikroskopie in der Zelllinie D analysiert, indem unstimulierte Zellen mit PMA/Ionomycin-stimulierten Zellen verglichen wurden. Die Zellen wurden nach der Stimulationszeit mit Antikörpern gegen murines Cathepsin B und gegen das lysosomale Membranprotein LAMP-2, als Lysosomenmarker, inkubiert und mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern gefärbt. Die Färbung unstimulierter Zellen zeigte eine deutlich punktuelle Verteilung von Cathepsin B in der Zelle (Abb. 3.8B, unbehandelt). Cathepsin B war in distinkten Strukturen organisiert, die gleichmäßig über die Zelle verteilt waren. Die LAMP-2-Färbung wies ein ähnliches Muster wie die Cathepsin B-Färbung auf, und viele Regionen zeigten eine Kolo-kalisation beider Fluoreszenzsignale (Abb. 3.8B, unbe-

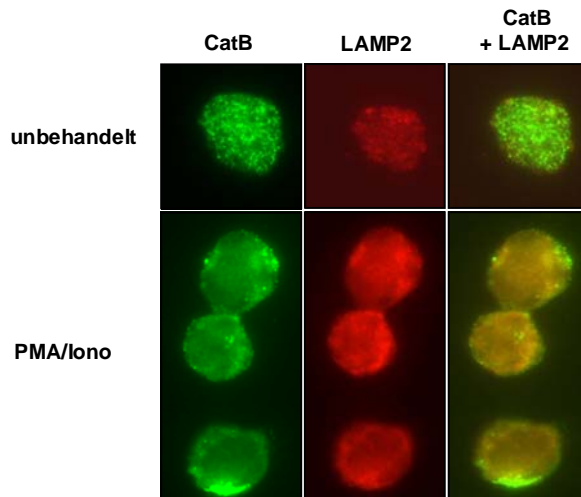
handelt, zweite und dritte Spalte). Die Färbung des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 lässt daher den Schluss zu, dass es sich bei den Strukturen mit Cathepsin B-Färbung größtenteils um Lysosomen handelt. Die Stimulation mit PMA/Ionomyzin führte zu einer deutlichen Veränderung der Cathepsin B-Färbung. Diese war diffus über die gesamte Zelle verteilt, und eine punktuelle Färbung von Cathepsin B war nur in wenigen Bereichen der Zellen erkennbar. Teilweise waren stark gefärbte Regionen in bestimmten Membranbereichen zu beobachten (Abb. 3.8B, PMA/Iono, erste Spalte). Die diffuse Cathepsin B-Färbung lässt vermuten, dass Cathepsin B nach PMA/Ionomyzin-Stimulation nicht mehr in distinkten Strukturen vorliegt, sondern im Zytosol verteilt ist. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzmikroskopischen Bilder ist als Diagramm in Abb. 3.8C dargestellt. Der Anteil der Zellen, die eine stark punktuelle Färbung für Cathepsin B zeigten, nahm nach Stimulation der Zellen deutlich ab, während der Anteil der Zellen, die eine diffuse Cathepsin B-Färbung zeigten, stimulationsabhängig zunahm. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass sich die zelluläre Lokalisation von Cathepsin B stimulationsabhängig ändert und unterstützen die in Abbildung 3.8A gezeigte Auslösung von LMP.

Der Übergang von punktueller zu diffuser Färbung nach PMA/Ionomyzin-Stimulation könnte durch die Freisetzung von Cathepsin B aus den Lysosomen ins Zytosol erklärt werden.

A)



B)



C)

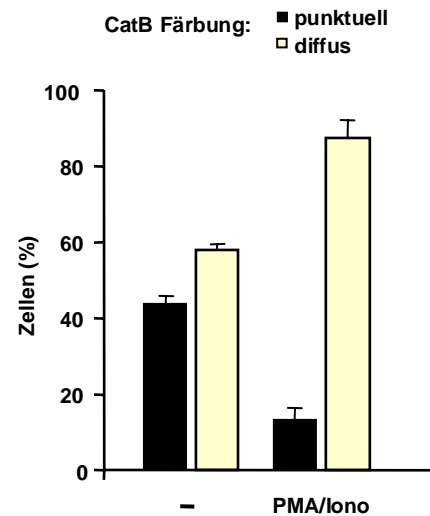


Abbildung 3.8: Die Lysosomen werden frühzeitig nach Stimulation des TZR-Signalweges in der Zelllinie D permeabilisiert, und Cathepsin B ändert seine zelluläre Lokalisation

A) Kinetik von LMP in der Zelllinie D, Acridinorange-Färbung: 5×10^5 Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) behandelt und im Anschluss mit Acridinorange gefärbt. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Der Anteil Zellen mit reduziertem Acridinorange-Signal wurde wie unter Material und Methoden angegeben berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Duplikaten. (n=3)

B) Cathepsin B-Färbung in unstimulierten und stimulierten Zellen der Zelllinie D: Pro Fluoreszenzmikroskopiepräparat wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt und mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μ M) für 2 bis 5 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorophor-gekoppelten anti-Cathepsin B Ak und anti-LAMP-2 Ak gefärbt. Die Cathepsin B-Fluoreszenz (CatB) wurde im GFP-Kanal (erste Spalte), die LAMP-2-Fluoreszenz (LAMP2) im Cy3-Kanal (zweite Spalte) des Fluoreszenzmikroskopes aufgenommen. Die Fluoreszenzen von Cathepsin B und LAMP-2 wurden übereinander gelegt, um die Koloalokalisation beider Proteine sichtbar zu machen (dritte Spalte). Gezeigt sind Bilder einer repräsentativen Färbung von zwei Experimenten.

C) Quantitative Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie: Das Färbemuster von Cathepsin B (CatB, punktuell vs diffus) in 40 gefärbten Zellen wurde von drei unabhängigen Personen analysiert und ist graphisch dargestellt. (n=2)

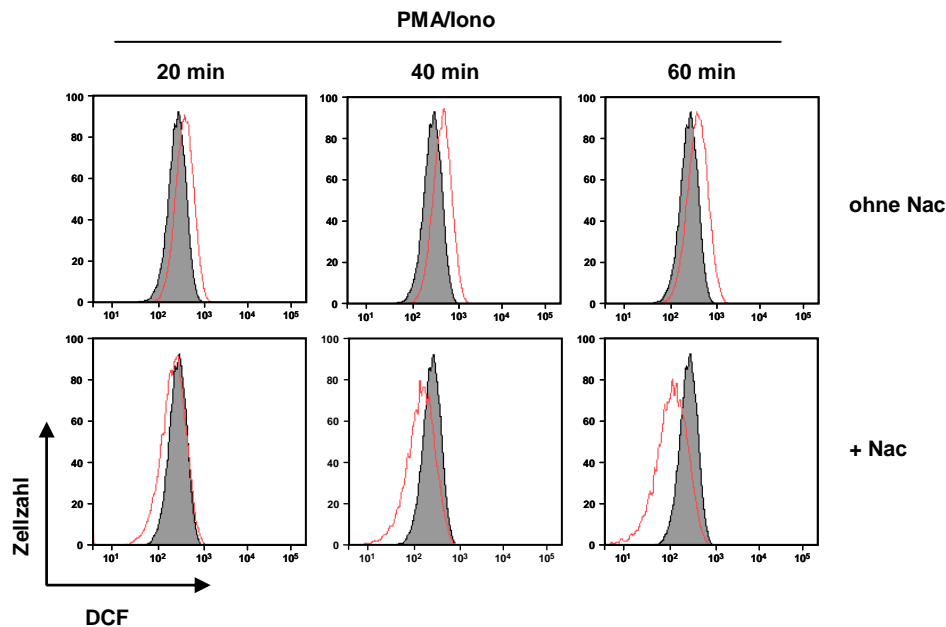
3.8 Die Generierung von ROS ist nicht verantwortlich für den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D

LMP ist mechanistisch bisher kaum verstanden. Es gibt Hinweise, dass LMP zu einer frühen Destabilisierung der Mitochondrienmembran führen kann. Hierbei wurden unter anderem freigesetzte Cathepsine und ROS als Faktoren identifiziert (Boya et al., 2003; Roberg et al., 2002). Allerdings ist die Generierung von ROS auch als ein möglicher Mechanismus für die Permeabilisierung der Lysosomen beschrieben (Antunes et al., 2001; Dare et al., 2001; Persson et al., 2003). Zur Überprüfung der Frage, ob ROS nach Auslösung von aktivierungsinduziertem Zelltod in der Zelllinie D gebildet werden und welchen Einfluss Radikale auf den Verlauf des Zelltodes haben, wurde die Zelllinie D mit dem ROS-sensitiven Farbstoff $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ gefärbt und anschließend für unterschiedliche Zeiten mit PMA/Ionomyzin stimuliert. Die Stimulation der Zelllinie D mit PMA/Ionomyzin führte zur Generierung von H_2O_2 (Abb. 3.9A, obere Reihe). Bereits nach 20 Minuten Stimulation wurde die Bildung von H_2O_2 induziert und nahm über die Zeit zu. H_2O_2 kann durch Radikalfänger wie Vitamin C oder N-Acetylcystein (Nac) neutralisiert werden. Aus diesem Grund wurde die Zelllinie D mit Nac inkubiert und anschließend die ROS-Generierung in den Zellen untersucht. Die Behandlung der Zellen mit Nac führte zu einer starken Reduzierung der H_2O_2 -Menge nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomyzin (Abb. 3.9A, untere Reihe). Der inhibierende Effekt von Nac wurde sowohl nach 20 Minuten Stimulation als auch nach 40 und 60 Minuten beobachtet. Die Behandlung mit Nac führte außerdem zu einer Reduktion der H_2O_2 -Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.9A untere Reihe, Vergleich rote Kurve zu grau gefüllter Fläche). Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass die Stimulation der Zelllinie D mit PMA/Ionomyzin die Generierung von ROS induziert und, dass das Antioxidanz Nac die Akkumulation von ROS nach PMA/Ionomyzin-Stimulation vollständig inhibieren kann.

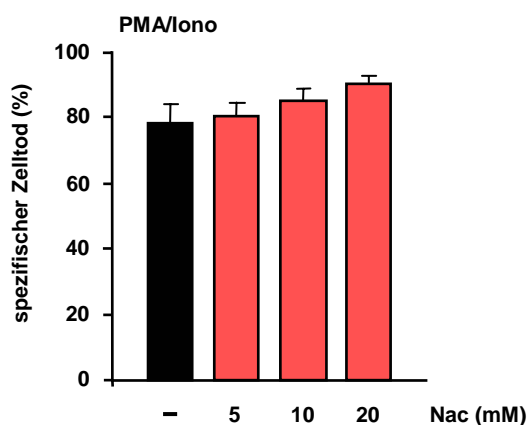
Des Weiteren wurde untersucht, ob die H_2O_2 -Entstehung im Zusammenhang mit dem aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D steht. Dazu wurden Zellen zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen Nac inkubiert und im Anschluss mit PMA/Ionomyzin stimuliert. Der aktivierungsinduzierte Zelltod wurde nach 18 Stunden im Durchflusszytometer analysiert. Stimulierte Zellen, die nicht mit Nac behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Obwohl Nac H_2O_2 nach PMA/Ionomyzin-Stimulation vollständig neutralisierte (Abb. 3.9A), wurde der aktivierungsinduzierte Zelltod nicht blockiert (Abb.

3.9B). Auch höhere Konzentrationen von Nac reduzierten den spezifischen Zelltod nicht. Die Zugabe von Nac erfolgte entweder 30 Minuten vor der Stimulation (Abb. 3.9B) oder zeitgleich mit der Stimulation (Daten nicht gezeigt). Der Zeitpunkt der Zugabe hatte keinen Einfluss auf das Experiment. Ein möglicher toxischer Effekt von Nac auf die Zellen wurde ebenfalls getestet. Keine der verwendeten Konzentrationen zeigte deutliche toxische Effekte (Abb. 3.9C)). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der Zelllinie D nach PMA/Ionomycin-Stimulation H_2O_2 gebildet wird, die Generierung von H_2O_2 allerdings nicht kausal für den aktivierungsinduzierten Zelltod ist.

A)



B)



C)

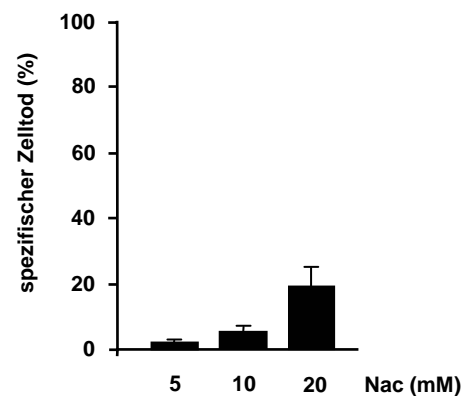


Abbildung 3.9: Die Entstehung von ROS nach PMA/Ionomycin-Stimulation ist nicht die Ursache für den aktivierungsinduzierten Zelltod.

A) ROS-Messung in unstimulierten und stimulierten Zellen der Zelllinie D: 2×10^5 Zellen wurden mit dem Farbstoff $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ gefärbt und für 20, 40 und 60 min mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μM) stimuliert (obere Reihe). Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen vor der Färbung und der Stimulation mit Nac (20 mM) behandelt (untere Reihe). Die Generierung von H_2O_2 wurde im Durchflusszytometer gemessen. Unstimulierte, gefärbte Zellen sind im Diagramm als graue, gefüllte Kurven dargestellt, stimulierte Zellen werden als rote Kurven gezeigt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten. (n=3)

B) Kein Effekt von Nac auf den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D: Zellen wurden in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/ cm^2) und mit Nac in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μM) stimuliert und nach 18 h wurde der Prozentsatz sterbender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Duplikaten. (n=2)

C) Nac zeigt nur geringe toxische Effekte in der Zelllinie D: Unstimulierte Zellen wurden wie unter B) beschrieben behandelt und der Prozentsatz sterbender Zellen nach 18 h durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Duplikaten. (n=2)

3.9 Die mRNA-Synthese von Cathepsin B ist während der T-Zellentwicklung differentiell reguliert

Die thymische Lymphomzelllinie D ähnelt T-Zellen im Thymus und exprimiert einen funktionellen TZR mit Hinblick auf die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade und der Generierung von ROS (Abb. 3.1 und Daten nicht gezeigt). Daher kann sie als Modell für Thymozyten-Studien verwendet werden. Da Tumorzelllinien keine Konstanz in den Linienmarkern zeigen, sind Aussagen über das thymische Entwicklungsstadium der Zelllinie D schwierig. Die bisher vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Nachahmung eines TZR-Signals mit PMA/Ionomycin in der Zelllinie D zum Tod der Zelle führt, der ohne Beteiligung von Caspasen verlaufen kann und von der Aktivität der lysosomalen Protease Cathepsin B abhängt. Daher ist es möglich, die Zelllinie D als Modell für Apoptose in Thymozyten zu nutzen. Unter physiologischen Bedingungen sterben Thymozyten während der negativen Selektion im Thymus. Dieser apoptotische Zelltod wird durch TZR-Stimulation ausgelöst. Studien zur negativen Selektion haben gezeigt, dass hierbei der klassische extrinsische Signalweg der Apoptose keine bedeutende Rolle spielt (Palmer, 2003). Vielmehr konnte die Abhängigkeit von dem *BH-3-only*-Protein Bim gezeigt werden, was eine Beteiligung des intrinsischen Signalweges während der negativen Selektion impliziert (Bouillet et al., 2002). Ungeklärt ist weiterhin, inwieweit die klonale Deletion Caspase-abhängig ist (Palmer, 2003). Um zu untersuchen, ob ein Cathepsin B-abhängiger Apoptoseweg in Thymozyten eine Rolle

spielt, wurden Thymozyten aus sechs bis zehn Wochen alten Mäusen für die weiteren Experimente verwendet.

Zunächst wurde überprüft, ob die mRNA-Synthese von Cathepsin B im Verlauf der T-Zellentwicklung reguliert ist. Primäre murine Thymozyten wurden präpariert, aufgereinigt und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Korezeptoren CD4 und CD8 gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Sortierung von DN-, DP- und SP-Thymozyten ($CD4^+$ oder $CD8^+$) im Durchflusszytometer. Die Menge der Cathepsin B-mRNA in den unterschiedlichen Thymozyten-Subpopulationen wurde mittels quantitativer RT-PCR (Q-PCR) gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass DP-Thymozyten im Vergleich zu DN- und SP-Thymozyten die höchste Cathepsin B-mRNA-Expression aufweisen (Abb. 3.10). Die Entwicklung von DN-Thymozyten zu DP-Thymozyten ist von einer deutlichen Induktion der mRNA-Synthese von Cathepsin B begleitet. Mit fortschreitender Entwicklung zu SP-Thymozyten nimmt die Menge der Cathepsin B-mRNA ab. Möglicherweise könnte die erhöhte Expression von Cathepsin B auf mRNA-Ebene darauf hin deuten, dass Cathepsin B eine funktionelle Relevanz für die negative Selektion hat.

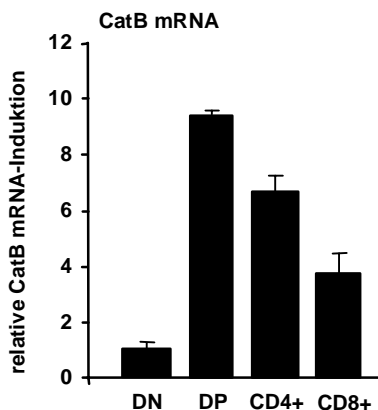


Abbildung 3.10: DP-Thymozyten zeigen eine erhöhte Cathepsin B-mRNA-Expression

Murine Thymozyten wurden anhand der Oberflächenexpression von CD4 und CD8 am Durchflusszytometer in DN-, DP-, $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten sortiert. Die Transkription von Cathepsin B (CatB) wurde mittels Q-PCR bestimmt. Gezeigt ist die relative mRNA Expression, normalisiert auf die GAPDH-Transkription. Die Cathepsin B-mRNA-Expression in DN-Thymozyten wurden auf eins gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. (n=3) DN = doppelt-negativ, $CD4^-CD8^-$; DP = doppelt-positiv, $CD4^+CD8^+$; $CD4^+$ = einzelpositiv, $CD4^+$; $CD8^+$ = einzelpositiv, $CD8^+$.

3.10 DP-Thymozyten sterben nach TZR-Stimulation partiell Cathepsin B-abhängig

Anschließend an die mRNA-Expressionsanalyse in primären Thymozyten sollte überprüft werden, ob die erhöhte Transkription von Cathepsin B in DP-Thymozyten in

einem funktionellen Zusammenhang mit ihrer Apoptosesensitivität steht. Dazu wurde TZR-vermittelte Apoptose in primären, murinen DP-Thymozyten *ex vivo* analysiert. Die *ex vivo*-Stimulation von DP-Thymozyten über ihren TZR löst Apoptose aus und kann daher klonale Deletion teilweise nachahmen (Starr et al., 2003). Aufgereinigte primäre murine DP-Thymozyten wurden mit dem Breitspektrum-Caspaseinhibitor q-VD-OPh (Quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-(-2,6-difluorophenoxy)-methyl Keton) und/oder dem Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk bzw. dem Cathepsin B-Inhibitor CA-074-me behandelt. Der Inhibitor q-VD-OPh gehört zu einer neuen Generation von Caspaseinhibitoren, die verminderte toxische Effekte zeigen und Caspasen wirksamer inhibieren als der Caspaseinhibitor zVAD-fmk (Caserta et al., 2003). Bereits in geringen Konzentrationen von 0,5 μ M blockiert q-VD-OPh effizient die Aktivität von Caspase-3 (Abb. 3.11D). Diese Caspase-Aktivitätsmessung belegt die Wirksamkeit von q-VD-OPh in der verwendeten Konzentration. Die Zellen wurden anschließend für 15 Stunden mit PMA/Ionomyzin oder mit Ak, die gegen CD3 oder CD28 gerichtet sind, stimuliert. Die Stimulation mit PMA/Ionomyzin löste Zelltod in DP-Thymozyten aus (Abb. 3.11A, schwarzer Balken). Die Hemmung von Caspasen mit dem Inhibitor q-VD-OPh verminderte den aktivierungsinduzierten Zelltod um mehr als 50 %, blockierte ihn aber nicht vollständig (Abb. 3.11A). Der Anteil des spezifischen Zelltodes, der nicht durch Caspaseinhibition blockierbar war, konnte durch den Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk vollständig blockiert werden (Abb. 3.11A). Der Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk allein hatte keinen inhibierenden Effekt auf den Zelltod (Abb. 3.11C). Die Ergebnisse konnten durch die TZR-Stimulation in Verbindung mit einer CD28-Kostimulation von primären murinen DP-Thymozyten bestätigt werden. So wurde durch Caspaseinhibition ebenfalls keine vollständige Blockade des TZR-induzierten Zelltodes erreicht (Abb. 3.11B). Lediglich 58 % des anti-CD3/CD28-induzierten Zelltodes wurden durch die Caspaseinhibition mit q-VD-OPh blockiert. Der durch q-VD-OPh nicht blockierbare Anteil des spezifischen Zelltodes konnte durch Hemmung von Cathepsin B fast vollständig inhibiert werden. Ebenso wie der Cathepsin B/L-Inhibitor z-FA-fmk konnte auch der Cathepsin B-Inhibitor CA074-me allein den CD3/CD28-induzierten Zelltod nicht blocken (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich schlussfolgern, dass TZR-induzierter Zelltod in DP-Thymozyten *ex vivo* sowohl von Caspasen als auch von Cathepsin B und/oder L vermittelt wird. Da primäre Thymozyten *ex vivo* sterben, sind siRNA-Experimente, welche die Rolle von Cathepsin B belegen können, in primären Thymozyten nicht durchführbar.

Ebenso wie Zellen der thymischen Lymphomzelllinie D zeigen murine DP-Thymozyten *ex vivo* einen Caspase-unabhängigen Signalweg beim TZR-vermittelten Zelltod, der von Cathepsin B und/oder L vermittelt werden kann.

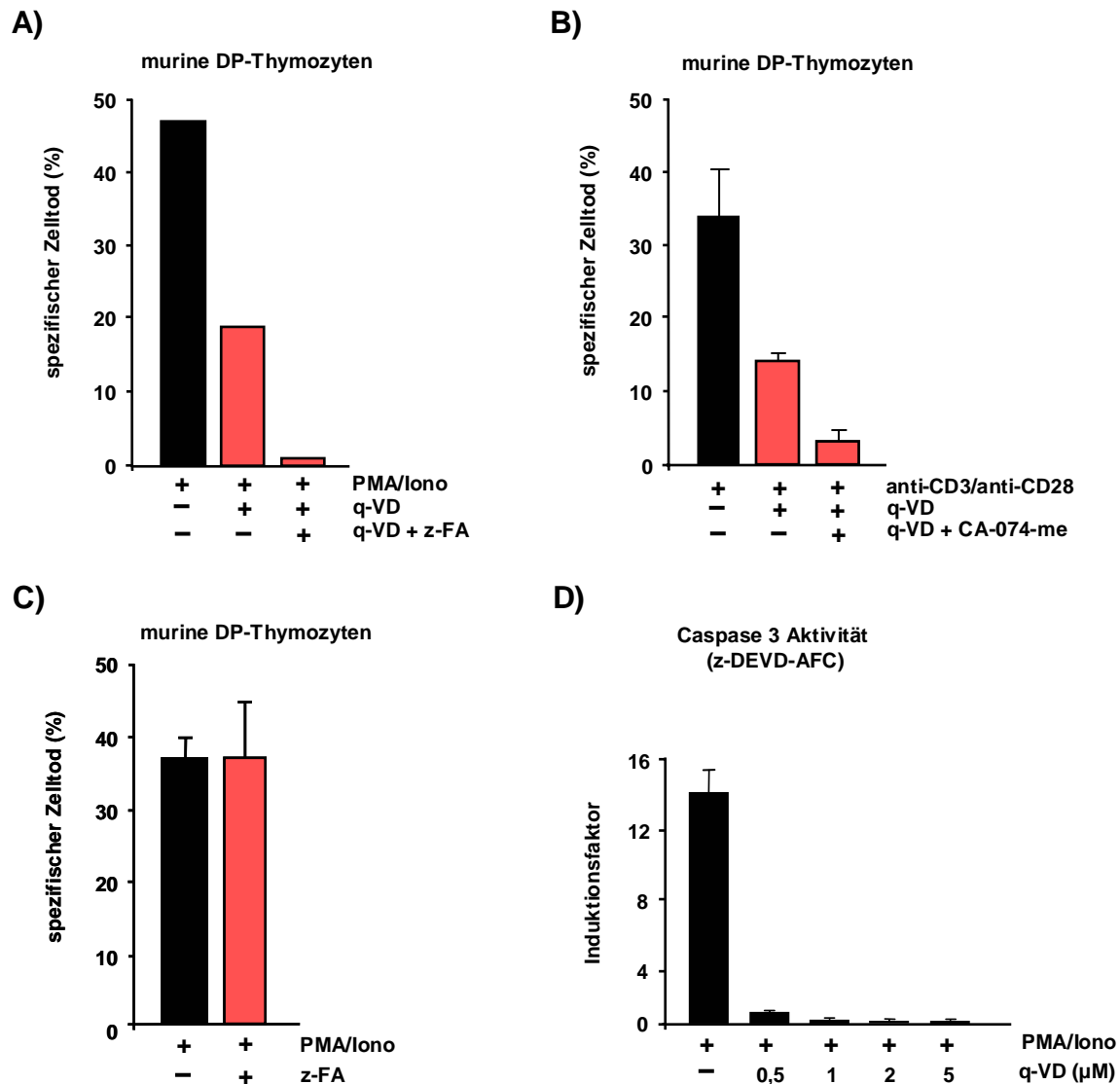


Abbildung 3.11: Ex vivo-Stimulation von DP-Thymozyten über den TZR induziert Apoptose, die partiell von Cathepsin B und/oder L abhängig ist.

A) PMA/Ionomycin-Stimulation von DP-Thymozyten: DP-Thymozyten wurden aus murinen Thymi anhand der Oberflächenexpression von CD4 und CD8 durchflusszytometrisch aufgereinigt. Die Zellen wurden in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²) und mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 μM) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in An- oder Abwesenheit des Caspaseinhibitors q-VD-Oph (q-VD, 5 μM) und/oder des Cathepsin B/L-Inhibitors z-FA-fmk (z-FA, 20 μM). Nach 15 h wurde der Prozentsatz sterbender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten. (n=3)

B) Anti-CD3/CD28-Stimulation von DP-Thymozyten: DP-Thymozyten wurden wie unter A) beschrieben aufgereinigt und in 48-Lochplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/cm²), die zuvor mit anti-CD3 Ak (10 µg/ml) und anti-CD28 Ak (50 µg/ml) beschichtet wurden. Die anti-CD3/CD28-Stimulation erfolgte in An- oder Abwesenheit des Caspaseinhibitors q-VD-OPh (q-VD, 5 µM) und/oder des Cathepsin B-Inhibitors CA-074-me (20 µM). Nach 15 h wurde der Prozentsatz sterbender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten. (n=2)

C) Cathepsin B/L-Inhibition allein hat keinen Einfluss auf den aktivierungsinduzierten Zelltod: DP-Thymozyten wurden wie unter A) beschrieben aufgereinigt und stimuliert. Nach 15 h wurde der Prozentsatz sterbender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und als spezifischer Zelltod angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten.

D) Der Breitspektrum-Caspaseinhibitor q-VD-OPh (q-VD) inhibiert potent die Aktivität von Caspase-3: Zellen der Zelllinie D wurden in 6-Lochplatten (1×10^5 Zellen/cm²) ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit PMA (100 ng/ml) und Ionomycin (Iono, 1 µM) stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit q-VD in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und Caspase-3-Aktivität wurde mit einem spezifischen fluorogenen Caspase-3-Substrat (z-DEVD-AFC) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten.

4 Diskussion

Apoptose nimmt im Immunsystem sowohl bei der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten als auch bei der Erhaltung der Zellhomöostase eine zentrale Stellung ein (Krammer, 2000; Vaux und Korsmeyer, 1999). Fehler bei der Regulation der Apoptose verursachen eine abnormale Zellentwicklung und -differenzierung, fördern die Entstehung von Immundefizienzen und Autoimmunerkrankungen und können zur Tumorbildung beitragen (Vaux und Flavell, 2000).

Per definitionem ist Apoptose ein energieverbrauchender Prozess, der durch Zeiose der Zelle, die Kondensation des Chromatins in der nukleären Peripherie, die Abschnürung apoptotischer Körperchen, sowie die Aktivierung von Caspasen gekennzeichnet ist (Samali et al., 1999). Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass die Ausprägungen des programmierten Zelltodes vielfältiger sind als angenommen und Zellen auch ohne die Aktivität von Caspasen sterben können. Die Existenz von Caspase-unabhängigem Zelltod wurde unter anderem in Neuronen, Hepatozyten und in aktivierten T-Zellen dokumentiert (Bidere und Senik, 2001; Cauwels et al., 2003; Deas et al., 1998; Guicciardi et al., 2001; Jaattela und Tschopp, 2003; Leist und Jaattela, 2001a). Auch bei der negativen Selektion von Thymozyten könnte Caspase-unabhängiges Zellsterben eine Rolle spielen, da die Beteiligung von Caspasen an diesem Prozess bisher nicht eindeutig gezeigt wurde (Bidere und Senik, 2001; Palmer, 2003). Obwohl für lysosomale Cathepsine eine Schlüsselrolle im Verlauf des Caspase-unabhängigen Zelltodes nachgewiesen wurde, sind die molekularen Signalwege bislang kaum bekannt. Ein detailliertes Verständnis des Verlaufs und der Regulation des Caspase-unabhängigen Zelltodes, sowie seiner Verknüpfung mit „klassischen“ Apoptosewegen ist daher erforderlich.

Die vorliegende Arbeit sollte der Mechanismus von TZR-induziertem Zelltod in Thymozyten analysieren. Hierzu wurde eine thymische Lymphomzelllinie als Modell etabliert. Dies geschah mit dem Ziel, die molekularen Prozesse im Verlauf von aktivierungsinduziertem Zelltod zu untersuchen. Anschließend wurde die Analyse auf primäre Thymozyten übertragen. Diese Experimente sollen helfen, die Vorgänge bei der negativen Selektion im Thymus zu verstehen.

Mit Hilfe der thymischen Lymphomzelllinie D als Thymozytenmodell wurde gezeigt, dass aktivierungsinduzierter Zelltod in Abwesenheit von Caspaseaktivität durch die lysosomale Protease Cathepsin B vermittelt wird. Der aktivierungsinduzierte Zelltod wies charakteristische Kennzeichen der Apoptose auf. Somit konnte Nekrose oder autophagischer Zelltod ausgeschlossen werden. Im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes kam es zu einer frühen Permeabilisierung der Lysosomen und einer Umverteilung von Cathepsin B in der Zelle. Darüber hinaus konnte in primären murinen DP-Thymozyten gezeigt werden, dass TZR-induzierter Zelltod unter Beteiligung eines Cathepsin B-abhängigen Signalweges verläuft. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen einen alternativen, bis dahin unbekannten Todessignalweg in Thymozyten, der möglicherweise eine Bedeutung bei der negativen Selektion im Thymus hat.

4.1 Die thymische Lymphomzelllinie D ermöglicht die Untersuchung des Zelltodes von Thymozyten *in vitro*

Geeignete Modellsysteme zum Studium der Selektionsprozesse im Verlauf der T-Zellentwicklung sind von großer Bedeutung, um beispielsweise zu verstehen, welche Signalwege die klonale Deletion von selbstreaktiven Thymozyten vermitteln. *In vivo*-Modelle, insbesondere TZR-transgene Mäuse, stellen eine elegante Möglichkeit dar, die Bedeutung einzelner Proteine für die negative Selektion durch Kreuzung mit den entsprechenden *Knockout*-Mäusen zu untersuchen. Eine detaillierte Analyse des Ablaufs und der Regulation der negativen Selektion ermöglichen diese Modelle allerdings nicht. Transformierte klonale thymische Lymphomzelllinien, die phänotypisch Thymozyten entsprechen, eröffnen jedoch die Möglichkeit, die molekularen Prozesse während der negativen Selektion *in vitro* zu untersuchen (Schmitz et al., 2006).

Thymische Lymphome entstehen spontan in Verbindung mit lymphogenen Retroviren in gealterten AKR/J-Mäusen, können aber auch in einigen anderen Mausstämmen durch Bestrahlung induziert werden (Sen-Majumdar et al., 1994). Die primären Tumore, die aus Thymozyten entstehen, haben häufig keinen vorherrschenden CD4/CD8-Phänotyp (De Heer et al., 1992; Richie et al., 1988). Die thymischen Lymphomzelllinien, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, exprimierten mehrheitlich die TZR β -Kette. Die Oberflächenexpression variierte von niedrig bis hoch (Tabelle 1). Diese Heterogenität in

der TZR-Expression weisen auch primäre Thymozyten im Verlauf ihrer Entwicklung auf (Hugo et al., 1991; Nakayama et al., 1990; Ohashi et al., 1990). Ob die heterogene Expression des TZR in den thymischen Lymphomzelllinien ebenfalls unterschiedliche Entwicklungsstadien widerspiegelt, wurde nicht untersucht. Zwei der analysierten Lymphomzelllinien exprimierten die Korezeptoren CD4 und CD8, die Mehrzahl war einfach-positiv für CD4 (Tabelle 1). Da Tumorzelllinien häufig keine Konstanz in den Linienmarkern zeigen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Lymphomzellen im Verlauf der Tumorgenese Korezeptoren und andere Oberflächenmoleküle „verloren“ haben. Daher sind Aussagen über das Entwicklungsstadium von diesen Zelllinien schwierig.

Die thymische Lymphomzelllinie D zeigte einen TZR $\beta^+CD4^+CD8^+CD95^+$ Phänotyp. Trotz der Oberflächenexpression von CD95 war die Zelllinie D nicht sensitiv gegenüber CD95L (Abbildung 3.1 und 3.2). Es ist bekannt, dass Tumorzellen häufig eine verringerte Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose zeigen (Reichmann, 2002). Daher ist es denkbar, dass der Verlust der CD95L-Sensitivität in der Zelllinie D zur Transformation dieser Zellen beigetragen hat. Mit dem Ziel TZR-vermittelten Zelltod von Thymozyten in einem *in vitro*-Modell zu untersuchen, erfolgte die Stimulation des TZR-Signalweges in der Zelllinie D mit PMA/Ionomycin. Die Stimulation der Zellen mit einem gegen CD3 gerichteten Ak löste keinen Zelltod aus (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache spricht dafür, dass der TZR-proximale Signalweg in der Zelllinie D unterbrochen ist. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Zellen defizient für das TZR-proximale Adaptermolekül SLP76 (engl.: *SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*) sind und kein Kalziumsignal generieren können (Daten nicht gezeigt). Das erklärt, warum Signale über den TZR nicht adäquat weitergeleitet werden können und eine direkte TZR-Stimulation im Gegensatz zur Stimulation des TZR-Signalweges mit PMA/Ionomycin keinen Zelltod in der Zelllinie D auslöst.

Die Tatsache, dass die Zelllinie D phänotypisch Thymozyten ähnelt und nach PMA/Ionomycin-Stimulation stirbt, eröffnet die Möglichkeit, aktivierungsinduzierten Zelltod in Thymozyten mit diesem Modell molekular zu untersuchen.

4.2 Caspase-Inhibition verhindert nicht aktivierungsinduzierten Zelltod in der thymischen Lymphomzelllinie D

Die Rolle der Caspasen im Verlauf der Apoptose wurde intensiv untersucht, unter anderem indem ihre Aktivität blockiert wurde. Dies geschah zum einen pharmakologisch durch Peptidinhibitoren, zum anderen mit endogenen oder viralen Caspaseinhibitoren oder durch Deletion von Caspase-Genen (Leist und Jaattela, 2001a; Lockshin und Zakeri, 2002). Diese Studien zeigten, dass Apoptose durch Caspaseinhibition signifikant verzögert bzw. verhindert werden kann. Es wurde jedoch auch deutlich, dass Zellen ohne die Aktivität von Caspasen einen programmierten Zelltod sterben können. So berichteten beispielsweise McCarthy und Kollegen, dass Zellen, die mit dem Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk behandelt wurden, weiterhin einige apoptotische Merkmale zeigten und der Zelltod nicht verhindert wurde (McCarthy et al., 1997).

Hilfreich für die Aufklärung der Caspase-Abhängigkeit des programmierten Zelltodes sind Caspase-Peptidinhibitoren. Hierbei handelt es sich um modifizierte Pseudosubstrate, die aus der Aminosäuresequenz eines idealen Caspasesubstrats bestehen. Häufig sind diese Peptidinhibitoren mit Fluoro- oder Chloromethylketon-Gruppen gekoppelt, die irreversibel an das aktive Zentrum der Caspasen binden und sie somit inhibieren (Ekert et al., 1999). Der Breitspektrum-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro-methylketon) zählt zu den bekanntesten Caspaseinhibitoren. Auf-grund einer Fluoromethylketon-Gruppe, die einen kovalenten Inhibitor-Enzym-Komplex formt, bindet z-VAD-fmk irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspasen (Thornberry et al., 1994; Thornberry et al., 1997). Als Breitspektrum-Caspaseinhibitor hemmt z-VAD-fmk die Aktivität von Caspase-1, -3, -5, -7, -8 und -9, während Caspase-2 nicht inhibiert wird (Garcia-Calvo et al., 1998). Durch die Fluoromethylketon-Gruppe besitzt der Inhibitor eine gute Zellmembranpermeabilität.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass z-VAD-fmk den aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D nicht verhindert (Abbildung 3.4). Selbst Konzentrationen von 50 μM z-VAD-fmk haben keinen inhibitorischen Effekt. Experimente mit Konzentrationen über 50 μM des Inhibitors sollten vorsichtig interpretiert werden, da unter diesen Bedingungen auch unspezifisch Cathepsin B und Calpaine inhibiert werden können (Schotte et al.,

1999). Von einigen Caspaseinhibitoren ist nicht bekannt, wie stabil diese innerhalb der Zelle sind (Ekert et al., 1999). Jedoch blockierte auch eine wiederholte Zugabe von z-VAD-fmk zu PMA/Ionomycin-stimulierten Zellen den Zelltod nicht (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte CD95-vermittelte Apoptose in einer Kontrollzelllinie schon mit niedrigen Konzentrationen z-VAD-fmk blockiert werden, was die Wirksamkeit des Inhibitors in den Experimenten belegt (Daten nicht gezeigt).

4.2.1 Der aktivierungsinduzierte Zelltod zeigt einen apoptotischen Phänotyp

Apoptose wird klassischerweise über die morphologische Veränderungen sterbender Zellen definiert. Dazu zählen unter anderem die Kondensation des Chromatins in der nukleären Peripherie, MOMP und die Asymmetrie der Zellmembran. Für diese Apoptosemerkmale sind Effektorcaspasen verantwortlich, die zelluläre Substrate spalten. Zelltod, der nicht durch Caspaseinhibition verhindert werden kann, weist deshalb häufig wenig morphologische Merkmale der Apoptose auf, wenngleich Caspase-unabhängiger Zelltod morphologisch charakterisiert werden kann (Leist und Jaattela, 2001a). Im Gegensatz zur „klassischen“ Apoptose wird in vielen Fällen keine Degradierung der DNA in 200 bp Fragmente und nur eine schwache Chromatinkondensation beobachtet (Chipuk und Green, 2005).

Die morphologische Charakterisierung des aktivierungsinduzierten Zelltodes in der Zelllinie D zeigt, dass sterbende Zellen PS auf ihrer Zelloberfläche exponieren, die DNA degradiert wird und das Membranpotential der Mitochondrien frühzeitig absinkt (Abbildung 3.4 und 3.5). Die Fragmentierung der DNA als typisches Apoptosemerkmal wurde sowohl durch die Färbung der DNA apoptotischer Zellkerne (Abbildung 3.4B) als auch in einer Elektrophorese als „DNA-Leiter“ nachgewiesen (Abbildung 3.5C). Im Verlauf der klassischen Apoptose werden diese morphologischen Merkmale durch die Caspase-vermittelte Spaltung zellulärer Substrate hervorgerufen. So wird die Fragmentierung der DNA unter anderem durch die Caspase-3-vermittelte Spaltung von ICAD ausgelöst (Sakahira et al., 1998). Unklar ist bislang, wodurch apoptotische Merkmale in Zellen hervorgerufen werden, die Caspase-unabhängig sterben. Es wurde berichtet, dass zelluläre Caspasesubstrate auch von Cathepsinen und Calpainen gespalten werden (Gobeil et al., 2001; Wang, 2000). Ferner zeigten Vancompernelle und Kollegen, dass rekombinantes Cathepsin B *in vitro* Chromatinkondensation auslöst

(Vancompernelle et al., 1998). Um zu testen, ob das Caspasesubstrat ICAD in der Zelllinie D auch Caspase-unabhängig gespalten werden kann, wurde das Spaltungsmuster von ICAD in PMA/Ionomyzin-stimulierten Zellen analysiert, die mit oder ohne z-VAD-fmk inkubiert wurden. Der Vergleich zeigte, dass die Spaltung von ICAD Caspase-abhängig verlief (Nicole Weit, Diplomarbeit, Heidelberg, 2007). Eine detaillierte Analyse von Apoptosesubstraten, die auch unabhängig von Caspasen gespalten werden können, wäre erforderlich, um die Ursache der apoptotischen Morphologie bei dem hier untersuchten Caspase-unabhängigen Zelltod genauer zu klären.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Caspaseinhibition die Morphologie sterbender Zellen verändert (Chautan et al., 1999; Vercammen et al., 1998). So wurde berichtet, dass hohe Konzentrationen von z-VAD-fmk *in vitro* einen Nekrose-ähnlichen Zelltod auslösen können (Gribble, 1973; Van Noorden, 2001). In stimulierten Zellen der Zelllinie D kann jedoch auch nach Behandlung mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Abbildung 3.4B). Daher lässt sich ausschließen, dass die Zelllinie D nach Caspaseinhibition nekrotisch stirbt, und es unterstreicht den apoptotischen Phänotyp des aktivierungsinduzierten Zelltodes in dieser Zelllinie.

4.2.2 Cathepsin B ist ein Schlüsselmolekül beim Caspase-unabhängigen Zelltod

Untersuchungen ergaben schon frühzeitig, dass in Zellen, die ohne Beteiligung von Caspasen starben, Cathepsine eine wichtige Rolle bei der Ausführung des Zelltodes spielen (Roberts et al., 1997). Von den elf Vertretern der Cathepsinfamilie sind bisher Cathepsin B, L und D im Zusammenhang mit Zelltod beschrieben worden. Die Bedeutung von Cathepsin B wurde durch die Analyse von Hepatozyten Cathepsin B-defizienter Mäuse belegt, die resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose sind (Guicciardi et al., 2000). Bestätigt wurden diese Daten dadurch, dass die pharmakologische Inhibition von Cathepsin B TNF-induzierte Leberschäden in Wildtyp-Mäusen verringert (Guicciardi et al., 2001).

Die Beteiligung von Cathepsin B am Caspase-unabhängigen aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe spezifischer Cathepsin B-Peptidinhibitoren untersucht. Die Behandlung stimulierter Zellen mit dem Cathepsin B/L-spezifischen Inhibitor z-FA-fmk oder dem Cathepsin B-spezifischen

Inhibitor CA-074-me verringert den Caspase-unabhängigen Zelltod (in Anwesenheit des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk) deutlich (Abbildung 3.6A). Außerdem wurde die Expression von Cathepsin B in der Zelllinie D mit Cathepsin B-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden herunterreguliert. Die Verringerung der Cathepsin B-Expression resultiert in einer Blockade des Caspase-unabhängigen Zelltodes und bestätigt die Ergebnisse aus der Inhibitorstudie (Abbildung 3.7). Dies lässt den Schluss zu, dass Cathepsin B im Vergleich zu Cathepsin L eine wichtigere Funktion beim aktivierungsinduzierten Zelltod hat. Der zellpermeable Inhibitor z-FA-fmk blockiert nicht nur Cathepsine, sondern auch die Effektorcaspasen-2, -3, -6 und -7 (Lopez-Hernandez et al., 2003). Allerdings ist die Caspasehemmung im Vergleich zu der Hemmung von Cathepsin B und L deutlich schwächer. CA-074-me ist ein Methylester des Cathepsin B-spezifischen Inhibitors CA-074 (L-*trans*-epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH propylamid), der irreversibel die Aktivität von Cathepsin B hemmt (Murata et al., 1991; Turk et al., 1995). Die Einführung der Methylgruppe führt zu einer deutlich besseren Membranpermeabilität im Vergleich zu CA-074 (Buttle et al., 1992). Kürzlich wurde jedoch die Selektivität von CA-074-me in Frage gestellt. In einigen Studien wurde beobachtet, dass CA-074-me neben Cathepsin B auch andere Cysteinproteasen inhibiert (Bogyo et al., 2000; Mihalik et al., 2004; Montaser et al., 2002). Montaser und Kollegen konnten durch *in situ* Markierung zeigen, dass CA-074-me nicht nur Cathepsin B bindet und inhibiert, sondern auch Cathepsin L. Inwieweit diese Unspezifität Einfluss auf die Hemmungsexperimente in Zellen hat, ist schlecht einzuschätzen, da es keine Angaben zur Inhibitionskinetik von Cathepsin L durch CA-074-me gibt. Die vorgelegten Ergebnisse der Inhibitorstudie lassen den Schluss zu, dass der Caspase-unabhängige Zelltod durch Cathepsin B und/oder L vermittelt wird, nicht jedoch, ob Cathepsin B allein für den Zelltod in Abwesenheit von Caspaseaktivität verantwortlich ist. Jedoch belegen die siRNA-Experimente, dass Cathepsin B den Caspase-unabhängigen Zelltod vermitteln kann. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cathepsin B ein essentieller Faktor in einem Signalweg ist, der ohne Caspasebeteiligung zum programmierten Tod der Zelle führt.

4.2.3 LMP und die Umverteilung von Cathepsin B in der Zelle sind frühe Vorgänge beim aktivierungsinduzierten Zelltod

Die Identifizierung von Cathepsinen bei der molekularen Aufklärung von Caspase-unabhängigem Zelltod lässt vermuten, dass diese Proteasen aus den Lysosomen in das Zytosol gelangen, um programmierten Zelltod mit einzuleiten. Diese Annahme setzt voraus, dass die Lysosomenmembran permeabilisiert wird und so lysosomale Proteasen freigesetzt werden können. Dass Cathepsine tatsächlich aus den Lysosomen in das Zytosol gelangen, wurde unter anderem für TNF-, CD95-, ROS-, Staurosporin- und Wachstumsfaktorentzug-induzierten Zelltod gezeigt (Brunk und Svensson, 1999; Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2000). LMP kann Apoptose, aber auch Apoptose-ähnlichen oder Nekrose-ähnlichen Zelltod auslösen (Boya et al., 2003; Brunk et al., 1997; Cirman et al., 2004; Kagedal et al., 2001b). Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Stärke von LMP und den morphologischen Ausprägungen des Zelltodes. Demnach können eine partielle Membranpermeabilisierung Apoptose und Apoptose-ähnliche Prozesse auslösen; ein völliger Verlust der Membranintegrität ruft Nekrose hervor.

Die Zelllinie D zeigt LMP bereits drei bis vier Stunden nach Stimulation des TZR-Signalweges (Abbildung 3.8A). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Cathepsin B-Verteilung ergab, dass sich die Lokalisation von Cathepsin B stimulationsabhängig ändert und die Kolo-kalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 abnimmt (Abbildung 3.8B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Cathepsin B aus den Lysosomen in das Zytosol freigesetzt wird. Eindeutigere Aussagen sind anhand der mikroskopischen Bilder nur schwer möglich, da die Auflösung und das ungünstige Verhältnis von Zytosol zum Nukleus in der Zelllinie D keine exaktere Analyse erlauben. Der beobachtete Verlust der lysosomalen Membranintegrität ist zeitabhängig und korreliert mit der frühzeitigen Umverteilung von Cathepsin B in der Zelle. Diese Ergebnisse unterstützen den Befund, dass LMP ein früher und möglicherweise initiierender Schritt im Verlauf des aktivierungsinduzierten Zelltodes ist.

Trotz der Fortschritte bei der Aufklärung von Cathepsin-vermitteltem Zelltod, bleibt der Mechanismus von LMP weiterhin unklar. Ein möglicher Mechanismus ist die Synthese von Sphingosin, das LMP fördern kann (Guicciardi et al., 2004). Die Aktivierung von Sphingomyelinasen an der Zellmembran und den Lysosomen führt zur Synthese von

Ceramid, das weiter zu Sphingosin prozessiert werden kann. Sphingosin akkumuliert in der sauren Umgebung der Lysosomen und destabilisiert in Folge die lysosomale Membran ähnlich wie ein Detergenz (Kagedal et al., 2001b). Ein möglicher Auslöser für LMP ist die Generierung von ROS, auf die im Abschnitt 4.2.4 näher eingegangen wird. Des Weiteren wird vermutet, dass sich in der lysosomalen Membran, ähnlich wie bei den Mitochondrien, Poren öffnen, die ein selektives Freisetzen von lysosomalen Proteasen erlaubt. Die Bildung von Membranporen wurde bisher nicht direkt gezeigt. Allerdings wurde beschrieben, dass phosphoryliertes aktives Bcl-2 teilweise die Lysosomen stabilisiert und somit Zelltod, der durch oxidativen Stress ausgelöst wurde, blockieren kann (Zhao et al., 2000, 2001). Neben extralysosomalen Signalen können auch intralysosomale Prozesse LMP unterstützen. So gibt es Hinweise darauf, dass Cathepsine nicht nur passiv aus den Lysosomen freigesetzt werden, sondern auch aktiv am LMP-Prozess teilnehmen können (Liu et al., 2003; Werneburg et al., 2002). Es lässt sich schlussfolgern, dass verschiedene Mechanismen Stimulus- und Zelltyp-spezifisch LMP auslösen. Eine Freisetzung von lysosomalen Proteasen durch spezifische Transporter wurde bisher nicht beschrieben. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass alle lysosomalen Proteasen proportional zum Ausmaß der Membranpermeabilisierung ins Zytosol entlassen werden.

4.2.4 Die Entstehung von ROS ist nicht verantwortlich für den aktivierungs-induzierten Zelltod

Einige Studien zeigen, dass ROS die Lysosomenmembran permeabilisieren kann. LMP wurde beispielsweise nach Schädigung von Zellen durch oxidativen Stress beobachtet (Zdolsek et al., 1993), darüber hinaus sind ROS in der Lage, die Schädigung der Lysosomen über einen Eisen-katalysierten oxidativen Prozess innerhalb der Lysosomen zu induzieren (Antunes et al., 2001; Dare et al., 2001; Persson et al., 2003). Zusätzlich können freigesetzte lysosomale Proteasen die Generierung von ROS unterstützen und so eine Rückkopplungsschleife erzeugen, die LMP verstärkt (Zhao et al., 2003).

Da die Entstehung von ROS möglicherweise in Verbindung mit einer Destabilisierung der Lysosomen steht und die Stimulation des TZR zur Generierung von ROS führt (Gulow et al., 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ROS ursächlich für den aktivierungsinduzierten Zelltod ist. Übereinstimmend mit der Beschreibung von

Gülow und Kollegen wurde ROS nach Stimulation des TZR-Signalweges in der Zelllinie D gebildet (Abbildung 3.9A). Antioxidantien, wie beispielsweise Nac, verhindern eine ROS-Generierung und Apoptose von primären T-Zellen nach TZR-Stimulation (Gulow et al., 2005). Die ROS-Entstehung in der Zelllinie D wird durch Nac blockiert, nicht aber der aktivierungsinduzierte Zelltod (Abbildung 3.9B). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ROS kein essentieller Faktor beim aktivierungsinduzierten Zelltod in der Zelllinie D sind. Weiterführende Studien werden sich zum einen mit der Frage beschäftigen, ob LMP durch Nac verhindert werden kann, und zum anderen damit, ob der Zelltod in der Zelllinie D bei gehemmter Caspaseaktivität durch Antioxidanzien blockierbar ist.

4.3 Primäre murine DP-Thymozyten sterben nach TZR-Stimulation partiell Cathepsin B und/oder L-abhängig

Das Sterben von T-Zellen ist unentbehrlich für ein funktionelles Immunsystem. Ein prominentes Beispiel ist die Eliminierung selbstreaktiver Thymozyten durch Apoptose im Thymus. Vermutlich verläuft die negative Selektion über einen Bim-abhängigen intrinsischen Apoptosemechanismus (Bouillet et al., 2002). Spekulativ ist weiterhin die Rolle der Caspasen im negativen Selektionsprozess. Einige Studien zeigen, dass die Deletion von Thymozyten ohne die Beteiligung von Caspasen abläuft (Doerfler et al., 2000; Hara et al., 2002; Smith et al., 1996), andere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass negative Selektion Caspase-abhängig ist (Doerfler et al., 2000; Izquierdo et al., 1999). Die Studien sind schwer vergleichbar, da einerseits pharmakologische Caspase-Peptidinhibitoren und andererseits virale Inhibitoren eingesetzt wurden, die unterschiedliche Affinitäten und Spezifitäten haben. Die gegensätzlichen Ergebnisse kommen möglicherweise auch dadurch zustande, dass verschiedene experimentelle Modelle für die negative Selektion verwendet wurden. Diese Selektionsmodelle sollen im Abschnitt 4.3.2 diskutiert werden.

Die Analyse des aktivierungsinduzierten Zelltodes in der Zelllinie D legt nahe, dass Thymozyten einen Caspase-unabhängigen Signalweg nutzen können, um apoptotisch zu sterben. Dieser Signalweg wird von der lysosomalen Protease Cathepsin B vermittelt, die vermutlich durch LMP ins Zytosol freigesetzt wird und über einen bislang unbekannten Mechanismus Caspase-unabhängig Zelltod auslöst. Um herauszufinden,

ob dieser Cathepsin B-abhängige Zelltod physiologisch relevant ist, wurde die Analyse auf primäre murine Thymozyten ausgedehnt.

4.3.1 Die mRNA-Synthese von Cathepsin B wird während der T-Zellentwicklung differentiell reguliert

Im Verlauf ihrer Entwicklung im Thymus weisen Thymozyten eine unterschiedliche Apoptosesensitivität auf. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche intrazellulären Signale bestimmen, ob DP-Thymozyten sterben oder sich weiter differenzieren. Einige Signalmoleküle, die für das Schicksal der Thymozyten entscheidend sind, werden entwicklungsabhängig reguliert. So wird das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in DN- und SP-Thymozyten im Vergleich zu DP-Thymozyten stark exprimiert. Diese biphasische Expression bestimmt möglicherweise die unterschiedliche Apoptosesensitivität (Fujii et al., 1994; Gratiot-Deans et al., 1993; Veis et al., 1993a). Des Weiteren wurde für die Proteinkinase MINK eine erhöhte Expression in DP-Thymozyten nachgewiesen. Dieser Kinase wird eine Schlüsselrolle bei der negativen Selektion zugeschrieben, da MINK-defiziente Mäuse Defekte bei der negativen Selektion haben (McCarty et al., 2005). Diese Beispiele zeigen, dass die entwicklungsabhängige Expression von Signalmolekülen Hinweise auf deren Relevanz bei der T-Zellentwicklung und -selektion geben kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob Cathepsin B in DP-Thymozyten exprimiert wird und ob die Expression in den unterschiedlichen Phasen der T-Zellentwicklung variiert. Die Analyse der mRNA-Expression in aufgereinigten primären murinen Thymozytenpopulationen zeigt, dass DP-Thymozyten die höchste Cathepsin B-mRNA-Menge exprimieren (Abbildung 3.10). Da die Cathepsin B-mRNA mit der Differenzierung in SP-Thymozyten ($CD4^+$ und $CD8^+$) abnimmt, spielt Cathepsin B möglicherweise während der Selektionsprozesse im DP-Stadium eine Rolle. Die durchflusszytometrische Aufreinigung der Thymozyten erfolgte mit Antikörpern, die gegen CD4 oder CD8 gerichtet waren. Daher ist es nicht möglich, beispielsweise im SP-Stadium, frühe oder späte SP-Thymozyten zu unterscheiden. Da die negative Selektion wahrscheinlich am Übergang von DP- zum SP-Stadium stattfindet, wäre es interessant zu überprüfen, ob frühe SP-Thymozyten eine höhere Cathepsin B-mRNA-Menge aufweisen als reife SP-Thymozyten.

4.3.2 DP-Thymozyten sterben ex vivo partiell Cathepsin B-abhängig

Des Weiteren wurde in der Arbeit untersucht, ob die erhöhte Menge an Cathepsin B-mRNA in DP-Thymozyten funktionell relevant für die negative Selektion ist. Um TZR-vermittelten Zelltod bei der negativen Selektion zu analysieren, stehen eine Vielzahl verschiedener experimenteller Modelle zur Verfügung (Starr et al., 2003). Ein häufig genutztes Modell für die negative Selektion sind TZR-transgene Mäuse, die einen für ein Selbst-Antigen spezifischen TZR und das entsprechende Selbst-Antigen exprimieren. Die klonale Deletion findet je nach Transgen entweder am Übergang vom DP- zum SP-Stadium oder in der SP-Entwicklungsphase statt. Die verfrühte Expression des TZR in DN-Thymozyten der TZR-transgenen Tiere hat einen nachteiligen Effekt, da TZR-Signale mit der Entwicklung von DP-Thymozyten interferieren (Takahama et al., 1992). Die Etablierung eines TZR β -transgenen Mausstammes eröffnete die Möglichkeit negative Selektion mit einem physiologischeren Modell zu untersuchen, da in diesen Tieren der $\alpha\beta$ -Rezeptor im physiologischen Zeitfenster exprimiert wird (Baldwin et al., 1999). Ein weiteres Selektionsmodell ist die Injektion spezifischer Peptide in TZR-transgene Mäuse (Murphy et al., 1990). Hierbei kann es jedoch zum einen zu einer starken Aktivierung reifer T-Zellen kommen, die zum Tod nicht antigenspezifischer DP-Thymozyten führen. Zum anderen können unspezifische Effekte durch die Zytokin-vermittelte Aktivierung von Stromazellen oder die Zerstörung der Thymusarchitektur hervorgerufen werden (Brabb et al., 1997; Lerner et al., 1996; Martin und Bevan, 1997). Auch durch die Injektion von monoklonalen Antikörpern, die gegen CD3 gerichtet sind, kann Zelltod in DP-Thymozyten ausgelöst werden. Allerdings zeigte sich, dass die massive Aktivierung von T-Zellen die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Steroidhormonen fördert, die unspezifisch Zelltod von DP-Thymozyten auslösen (Martin und Bevan, 1997; Page et al., 1998; Xue und Horvitz, 1995). Diese nachteiligen Effekte können bei einer *in vitro*-Stimulation mit Ak gegen CD3 umgangen werden, allerdings stirbt ein hoher Anteil der isolierten DP-Thymozyten, aufgrund der fehlenden thymischen Mikroumgebung. Darüber hinaus induziert die TZR-Stimulation mit kreuzvernetzenden Antikörpern ein qualitativ anderes TZR-Signal als die Bindung von MHC-Peptid-Komplexen. Da die *in vitro*-Stimulation von DP-Thymozyten mit einem gegen CD3 gerichteten Ak ein einfaches und leicht durchführbares Modell für negative Selektion ist, findet es trotz der Nachteile in *in vitro*-Studien Anwendung.

Um in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob TZR-vermittelter Zelltod von DP-Thymozyten im Verlauf der negativen Selektion Caspase-abhängig verläuft, wurde der TZR-Signalweg in aufgereinigten primären murinen DP-Thymozyten direkt oder indirekt mit PMA/Ionomyzin aktiviert und die Zellen mit Kombinationen von Caspase- und Cathepsin B/L-Inhibitoren behandelt. Der aktivierungsinduzierte Zelltod nach Stimulation mit PMA/Ionomyzin verläuft teilweise Caspase-unabhängig und wird von Cathepsin B und/oder L vermittelt (Abbildung 3.11A). Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Experimente, in denen DP-Thymozyten mit gegen CD3 sowie gegen CD28 gerichteten Ak stimuliert wurden (Abbildung 3.11B). Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit einem gegen CD28 gerichteten AK ist notwendig, um *in vitro* Apoptose in DP-Thymozyten auszulösen, da eine effiziente klonale Deletion von kostimulatorischen Molekülen abhängt (Page et al., 1993; Punt et al., 1994). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Caspase-unabhängiger, von Cathepsin B vermittelter Signalweg nicht nur in der Zelllinie D, sondern auch in primären murinen DP-Thymozyten Zelltod auslösen kann.

Die Stimulation von DP-Thymozyten mit niedrigen Konzentrationen PMA/Ionomyzin kann auch die Differenzierung zu SP-Thymozyten auslösen (Takahama und Nakauchi, 1996; Tanahashi et al., 2001). In den vorliegenden Experimenten erfolgte die Thymozytenstimulation mit deutlich höheren Konzentrationen von PMA und Ionomyzin, so dass der pro-apoptotische Effekt überwog. Im Gegensatz zur Zelllinie D kann in DP-Thymozyten durch Caspaseinhibition ein deutlich größerer Anteil des Zelltodes blockiert werden (Vergleich Abbildung 3.4 und 3.11). Diese Divergenz ist möglicherweise durch die Verwendung zweier verschiedener Caspaseinhibitoren, z-VAD-fmk und q-VD-OPh, bedingt. Der Caspaseinhibitor q-VD-OPh gehört zu einer neuen Generation von Breitspektrum-Caspaseinhibitoren und ist für den Einsatz in primären Zellen und für die Anwendung *in vivo* beschrieben (Caserta et al., 2003; Chauvier et al., 2007). Dieser Inhibitor ist im Vergleich zu z-VAD-fmk weniger toxisch und inhibiert effizienter ein breiteres Spektrum an Caspasen (Chauvier et al., 2007). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass q-VD-OPh in der verwendeten Konzentration wirksamer und spezifischer Caspasen inhibiert als z-VAD-fmk. Die Reduktion des TZR-induzierten Zelltodes um etwa 50 % durch q-VD-OPh in primären Thymozyten weist darauf hin, dass dieser Zelltod partiell Caspase-abhängig verläuft, die Zellen aber bei einer Blockade des Caspase-abhängigen Signalweges Cathepsin B und/oder L nutzen können, um nach TZR-Stimulation zu sterben. Es wird vermutet, dass verschiedene Signalwege während

des negativen Selektionsprozesses gemeinsam zum Zelltod von selbstreaktiven Thymozyten führen und diese sich teilweise gegenseitig kompensieren können.

4.4 Ausblick und Modell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thymozyten nach Stimulation ihres TZR auch ohne die Aktivität von Caspasen apoptotisch sterben können und dieser Caspase-unabhängige Zelltod von der lysosomalen Protease Cathepsin B vermittelt wird. Als experimentelle Modelle wurden die thymische Lymphomzelllinie D und primäre murine Thymozyten eingesetzt, die über den TZR stimuliert wurden. Kürzlich wurde gezeigt, dass Thymozyten Cathepsin B zur Amplifizierung einer Apoptosesignalkaskade nutzen, wenn sie mit Glukokortikoiden stimuliert werden (Wang et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal eine apoptotische Funktion von Cathepsin B in Thymozyten und zeigt, dass Cathepsin B in einem TZR-induzierten Signalweg steht, der bei fehlender Caspaseaktivität apoptotischen Zelltod in Thymozyten auslösen kann. Die Analyse dieses Cathepsin B-abhängigen Signalweges ergab, dass die Stimulation der TZR-Signalkaskade zu LMP führt und vermutlich infolgedessen Cathepsin B aus den Lysosomen in das Zytosol freigesetzt wird. Bislang ist noch nicht verstanden, wodurch LMP ausgelöst wird und wie dieser Prozess mechanistisch abläuft. In der Literatur finden sich Hinweise, dass die intralysosomale Synthese von Sphingosin die Lysosomenmembran destabilisieren kann. Um die Relevanz dieses Prozesses in der thymischen Lymphomzelllinie D zu prüfen, könnte die Stabilität der Lysosomen in Anwesenheit von Sphingomyelinaseinhibitoren analysiert werden. Des Weiteren wurde ein ROS-abhängiger Mechanismus postuliert, der durch die Freisetzung von Cathepsinen verstärkt werden kann. In der Zelllinie D werden ROS nach PMA/Ionomyzin-Stimulation zwar produziert, sie sind aber nicht essentiell für den aktivierungsinduzierten Zelltod. Allerdings wurde bislang nicht überprüft, welche Relevanz ROS in Zellen haben, in denen Caspasen inhibiert sind. Außerdem soll geklärt werden, ob ROS für LMP verantwortlich sind. Eine zentrale Frage ist, welcher Signalweg nach PMA/Ionomyzin-Stimulation die Permeabilisierung auslöst. Möglicherweise sind die Aktivierung von PKC-Isoformen und der Einstrom von Kalzium entscheidend, da PMA als PKC-Aktivator beschrieben wurde und Ionomyzin ein Ionophor ist, welches zum Einstrom von Kalzium führt (Baier, 2003).

Lysosomale Proteasen sind optimal an den niedrigen pH-Wert in den Lysosomen angepasst und haben ihr Aktivitätsoptimum im saurem pH-Bereich. Deshalb setzt der Austritt von Cathepsin B aus den Lysosomen ins Zytosol voraus, dass Cathepsin B auch bei zytosolischem pH stabil und aktiv ist. Tatsächlich zeigen einige Studien, dass lysosomale Proteasen, insbesondere Cathepsin B, mehrere Stunden bei neutralen pH aktiv sind (Turk et al., 1993; Turk et al., 2000; Turk et al., 1995). Denkbar ist auch, dass es durch LMP zu einer Ansäuerung des Zytosols kommt und sich der zytosolische pH-Wert dem der Lysosomen angleicht. Der Nachweis von aktivem Cathepsin B im Zytosol nach Stimulation des TZR-Signalweges über so genanntes *active-site-labeling* ist ein wichtiges Ziel und soll in zukünftigen Experimenten erfolgen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Zellen mit Hilfe von Cathepsin B auch bei fehlender Caspaseaktivität sterben können. Da Caspasen aber für die Spaltung verschiedener zellulärer Substrate notwendig sind, die letztendlich zum programmierten Tod der Zelle führt, kann davon ausgegangen werden, dass die Substratspaltung in Thymozyten durch andere Proteasen oder durch Cathepsin B selbst vermittelt werden kann. Der Nachweis dafür steht noch aus, es ist aber bekannt, dass das Caspasesubstrat PARP im Verlauf von Nekrose durch Cathepsin B gespalten werden kann (Gobeil et al., 2001).

Die Ergebnisse aus der Studie der thymischen Lymphomzelllinie D und primärer muriner Thymozyten sind als Modell in Abbildung 4.1 dargestellt. Die direkte Stimulation des TZR bzw. die Stimulation mit PMA/Ionomycin führt unter anderem zu einem Kalziumeinstrom und der Aktivierung von verschiedenen PKC-Isoformen (Baier, 2003). In der stimulierten Zelle wird zum einen der mitochondriale Signalweg induziert, der durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Aktivierung einer Caspasekaskade gekennzeichnet ist. Möglicherweise spielt das *BH3-only*-Protein Bid eine entscheidende Rolle bei der Initiierung dieses intrinsischen Signalweges (Stoka et al., 2001). Dieser Caspase-abhängige aktivierungsinduzierte Zelltod kann durch Caspaseinhibition blockiert werden. Zum anderen wird ein lysosomaler Signalweg aktiviert, in dessen Verlauf die Lysosomen permeabilisiert werden. Die Signale, die den TZR-Signalweg mit den Lysosomen verknüpfen, sind bislang unbekannt. ROS könnten LMP bewirken und somit den lysosomalen mit dem Caspase-abhängigen Signalweg verknüpfen. Möglicherweise wird so sichergestellt, dass Zelltod auch in Zellen ablaufen kann, in denen Caspaseaktivität blockiert ist. Durch LMP könnte es zu einer Freisetzung von Cathepsin B ins Zytosol kommen. Hinweise darauf geben die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.8). Anschließend könnte

zytosolisches aktives Cathepsin B Apoptosesubstrate, wie beispielsweise PARP und Fodrin, spalten und so letztendlich den Tod der Zellen auslösen.

Die Tatsache, dass auch primäre murine DP-Thymozyten nach TZR-Stimulation unter Beteiligung eines Cathepsin B-abhängigen Signalweges sterben, zeigt, dass dieser Signalweg kein Zelllinienartefakt ist. Außerdem deuten diese Ergebnisse auf eine physiologische Relevanz des Signalweges in der negativen Selektion hin. Weiterführende Experimente sollen sich mit der Frage beschäftigen, ob Cathepsin B in einem physiologischeren Modell der negativen Selektion von Bedeutung ist. Dazu soll zum einen monoklonaler Ak gegen CD3 in Wildtyp- und Cathepsin B-*Knockout*-Mäuse injiziert werden, die mit oder ohne z-VAD-fmk behandelt wurden. Zum anderen soll negative Selektion in FTOK nachgestellt werden. In präliminären FTOK-Experimenten zeigte sich, dass der Zelltod von DP-Thymozyten in Cathepsin B-*Knockout*-Mäusen vollständig durch z-VAD-fmk blockiert werden kann, nicht aber in Wildtyp-Mäusen.

Negative Selektion ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung eines funktionellen Immunsystems, da sie einen effizienten Mechanismus darstellt, um selbstreaktive Thymozyten aus dem T-Zellrepertoire zu eliminieren. Zum jetzigen Zeitpunkt herrscht wenig Konsens über die Signalwege, welche die klonale Deletion der Thymozyten auslösen. Die Identifizierung des Mechanismus der negativen Selektion ist essentiell, um zu verstehen, wie Thymozyten zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ unterscheiden. Das molekulare Verständnis der negativen Selektion kann die Grundlage einer zukünftigen Therapie von Autoimmunerkrankungen bilden.

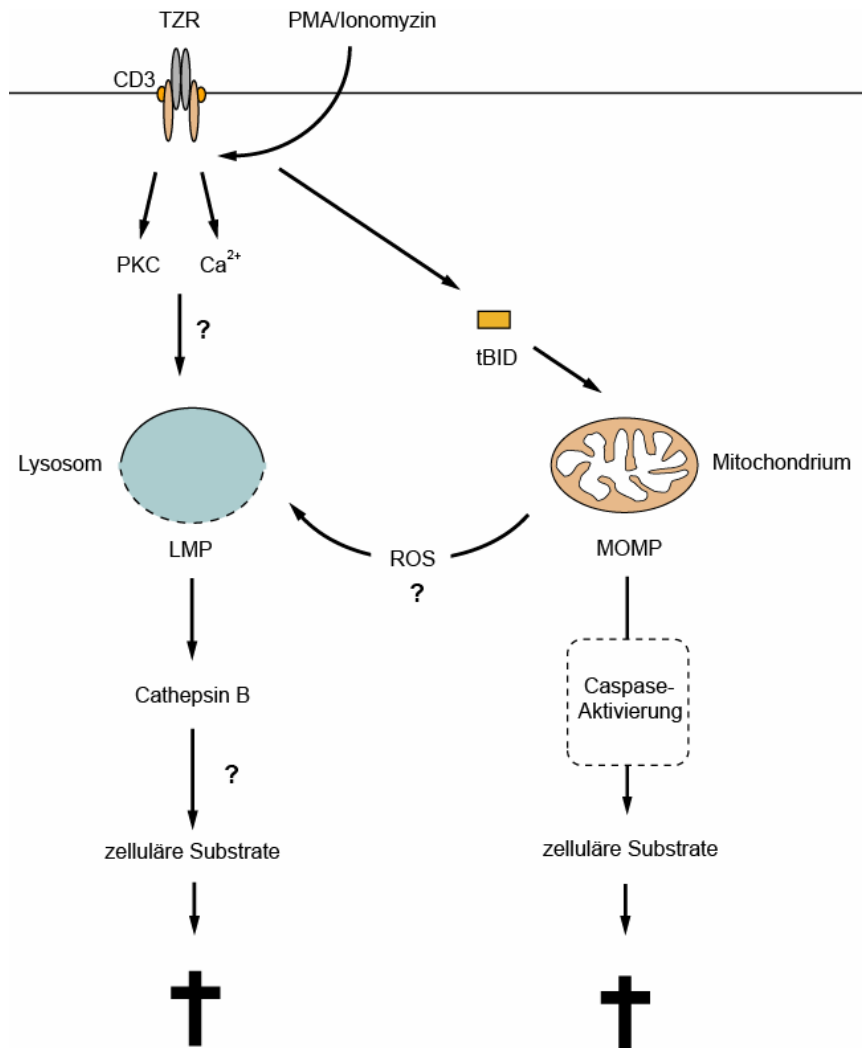


Abbildung 4.1: Modell des Cathepsin B-vermittelten, Caspase-unabhängigen Zelltodes nach Stimulation des TZR-Signalweges in Thymozyten

Die Stimulation des TZR-Signalweges löst zwei unterschiedliche Signalwege aus, die zum apoptotischen Tod der Zelle führen. Einerseits kann über die Spaltung und Aktivierung von pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern wie Bid (tBid) MOMP induziert werden. Dieser intrinsische Signalweg initiiert die Aktivierung von Caspasen, die den Tod der Zelle verursachen. Des Weiteren wird LMP ausgelöst, was zum Austritt von Cathepsin B führt. Der Mechanismus der Permeabilisierung ist unbekannt, möglicherweise induzieren ROS LMP. Vermutlich können zelluläre Substrate direkt durch Cathepsin B gespalten werden, wodurch die Zelle stirbt.

Die Fragezeichen machen noch ungeklärte Signalwege deutlich. Einzelheiten siehe 4.4.

5 Literaturverzeichnis

- Aguado, E., Richelme, S., Nunez-Cruz, S., Miazek, A., Mura, A.M., Richelme, M., Guo, X.J., Sainty, D., He, H.T., Malissen, B., *et al.* (2002). Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science* 296, 2036-2040.
- Aiba, Y., Mazda, O., Davis, M.M., Muramatsu, S., and Katsura, Y. (1994). Requirement of a second signal from antigen presenting cells in the clonal deletion of immature T cells. *Int Immunol* 6, 1475-1483.
- Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C., and Gascoigne, N.R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921.
- Amsen, D., and Kruisbeek, A.M. (1998). Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev* 165, 209-229.
- Anderson, G., and Jenkinson, E.J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1, 31-40.
- Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.
- Antunes, F., Cadenas, E., and Brunk, U.T. (2001). Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 356, 549-555.
- Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C.R., and Krammer, P.H. (2006). How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36, 1654-1658.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., and Youle, R.J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22, 4385-4399.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.
- Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A., Delaney, J.R., Van Kaer, L., Pircher, H.P., Zinkernagel, R.M., and Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76, 651-663.
- Baehrecke, E.H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 505-510.
- Baier, G. (2003). The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev* 192, 64-79.
- Baldwin, K.K., Trenchak, B.P., Altman, J.D., and Davis, M.M. (1999). Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol* 163, 689-698.
- Barclay, A.E., Franklin, K.J., and Prichard, M.M.L. (1944). The foetal circulation and cardiovascular system. Oxford: Blackwell scientific publications, Ltd.
- Bergmann, A. (2007). Autophagy and cell death: no longer at odds. *Cell* 131, 1032-1034.
- Bernardi, P., Colonna, R., Costantini, P., Eriksson, O., Fontaine, E., Ichas, F., Massari, S., Nicoli, A., Petronilli, V., and Scorrano, L. (1998). The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* 8, 273-281.
- Berzins, S.P., Godfrey, D.I., Miller, J.F., and Boyd, R.L. (1999). A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9787-9791.

- Bhardwaj, A., and Aggarwal, B.B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23, 317-332.
- Bidere, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C., and Senik, A. (2003). Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* 278, 31401-31411.
- Bidere, N., and Senik, A. (2001). Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis* 6, 371-375.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli, K.J., and Grutter, M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* 7, 1125-1133.
- Blomgran, R., Zheng, L., and Stendahl, O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol* 81, 1213-1223.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschoop, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27, 19-26.
- Bogyo, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S., and Greenbaum, D. (2000). Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem Biol* 7, 27-38.
- Bohley, P., and Seglen, P.O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48, 151-157.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1, 87-98.
- Borgulya, P., Kishi, H., Uematsu, Y., and von Boehmer, H. (1992). Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell* 69, 529-537.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M., and Kroemer, G. (2003). Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 197, 1323-1334.
- Brabb, T., Rubicz, R., Mannikko, V., and Gorman, J. (1997). Separately expressed T cell receptor alpha and beta chain transgenes exert opposite effects on T cell differentiation and neoplastic transformation. *Eur J Immunol* 27, 3039-3048.
- Brandle, D., Muller, C., Rulicke, T., Hengartner, H., and Pircher, H. (1992). Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9529-9533.
- Brenner, D., Golks, A., Becker, M., Müller, W., Frey, C.R., Novak, R., Melamed, D., Kiefer, F., Krammer, P.H., and Arnold, R. (2007). Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood* 110, 3968-3977.
- Brunk, U.T., Dalen, H., Roberg, K., and Hellquist, H.B. (1997). Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 23, 616-626.
- Brunk, U.T., Neuzil, J., and Eaton, J.W. (2001). Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep* 6, 91-97.
- Brunk, U.T., and Svensson, I. (1999). Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep* 4, 3-11.
- Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., Honn, K.V., and Sloane, B.F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1), 273-278.
- Buttle, D.J., Murata, M., Knight, C.G., and Barrett, A.J. (1992). CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Arch Biochem Biophys* 299, 377-380.
- Cai, J., and Jones, D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273, 11401-11404.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000).

- Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.
- Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1995). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3, 273-282.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A., and Brown, T.L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.
- Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., and Brouckaert, P. (2003). Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 4, 387-393.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1998). Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967-970.
- Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., and Jacotot, E. (2007). Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ* 14, 387-391.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.
- Cheung, E.C., Joza, N., Steenaart, N.A., McClellan, K.A., Neuspiel, M., McNamara, S., MacLaurin, J.G., Rippstein, P., Park, D.S., Shore, G.C., *et al.* (2006). Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *Embo J* 25, 4061-4073.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 268-275.
- Cho, H.J., Edmondson, S.G., Miller, A.D., Sellars, M., Alexander, S.T., Somersan, S., and Punt, J.A. (2003). Cutting edge: identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J Immunol* 170, 10-13.
- Cirman, T., Oresic, K., Mazovec, G.D., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G.S., and Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* 279, 3578-3587.
- Clarke, P.G., and Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193, 81-99.
- Clayton, L.K., Ghendler, Y., Mizoguchi, E., Patch, R.J., Ocain, T.D., Orth, K., Bhan, A.K., Dixit, V.M., and Reinherz, E.L. (1997). T-cell receptor ligation by peptide/MHC induces activation of a caspase in immature thymocytes: the molecular basis of negative selection. *EMBO J* 16, 2282-2293.
- Clem, R.J., Fechheimer, M., and Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
- Cole, R.K., Furth, M. D. (1941). Experimental studies on the genetics on spontaneous leukemia in mice. *Cancer Res* 1, 957-965.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Cretney, E., Uldrich, A.P., Berzins, S.P., Strasser, A., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2003). Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice. *J Exp Med* 198, 491-496.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Dare, E., Li, W., Zhivotovsky, B., Yuan, X., and Ceccatelli, S. (2001). Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. *Free Radic Biol Med* 30, 1347-1356.
- de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137, 391-397.
- De Heer, C., De Geus, B., Schuurman, H.J., Van Loveren, H., and Rozing, J. (1992). V β gene family usage in spontaneous lymphomas of AKR

- mice: Evidence for defective clonal deletion. *Developmental Immunology* 2, 95-101.
- Deas, O., Dumont, C., MacFarlane, M., Rouleau, M., Hebib, C., Harper, F., Hirsch, F., Charpentier, B., Cohen, G.M., and Senik, A. (1998). Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 161, 3375-3383.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 15, 3861-3870.
- Demoz, M., Castino, R., Cesaro, P., Baccino, F.M., Bonelli, G., and Isidoro, C. (2002). Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNFalpha, not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D. *Biol Chem* 383, 1237-1248.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2, 1032-1039.
- Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H., and Villadangos, J.A. (1998). Cathepsin B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8, 4516-4521.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.
- Doerfler, P., Forbush, K.A., and Perlmutter, R.M. (2000). Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. *J Immunol* 164, 4071-4079.
- Donskoy, E., and Goldschneider, I. (1992). Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. *J Immunol* 148, 1604-1612.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Ekert, P.G., Silke, J., and Vaux, D.L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6, 1081-1086.
- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A., and Villunger, A. (2005). BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106, 4131-4138.
- Ferri, K.F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153, 999-1010.
- Foy, T.M., Page, D.M., Waldschmidt, T.J., Schoneveld, A., Laman, J.D., Masters, S.R., Tygrett, L., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Claassen, E., et al. (1995). An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* 182, 1377-1388.
- French, L.E., and Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* 10, 117-123.
- Fujii, Y., Okumura, M., Takeuchi, Y., Inada, K., Nakahara, K., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1994). Bcl-2 expression in the thymus and periphery. *Cell Immunol* 155, 335-344.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-1049.
- Gao, Z., Tian, Y., Wang, J., Yin, Q., Wu, H., Li, Y.M., and Jiang, X. (2007). A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem* 282, 30718-30727.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-32613.
- Glucksmann, A. (1965). Cell death in normal development. *Arch Biol (Liege)* 76, 419-437.

- Gobeil, S., Boucher, C.C., Nadeau, D., and Poirier, G.G. (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 8, 588-594.
- Goldstein, B., Faeder, J.R., and Hlavacek, W.S. (2004). Mathematical and computational models of immune-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 445-456.
- Gong, Q., Cheng, A.M., Akk, A.M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A.C. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2, 29-36.
- Gratiot-Deans, J., Ding, L., Turka, L.A., and Nunez, G. (1993). bcl-2 proto-oncogene expression during human T cell development. Evidence for biphasic regulation. *J Immunol* 151, 83-91.
- Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Gribble, G.W. (1973). Fluoroacetate toxicity. *J Chem Educ* 50, 460-462.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192.
- Grillot, D.A., Merino, R., Pena, J.C., Fanslow, W.C., Finkelman, F.D., Thompson, C.B., and Nunez, G. (1996). bcl-x exhibits regulated expression during B cell development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *J Exp Med* 183, 381-391.
- Groettrup, M., Ungewiss, K., Azogui, O., Palacios, R., Owen, M.J., Hayday, A.C., and von Boehmer, H. (1993). A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell* 75, 283-294.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Millman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999b). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-1163.
- Gross, L. (1962). Studies on the pathogenic properties and natural transmission of a mouse leukemia virus. in GEW Wolstenholme und M O'Connor (eds), *Tumor viruses of murine origin*, Ciba Foundation Symposium, J & A Churchill Ltd, p.176.
- Groves, T., Katis, P., Madden, Z., Manickam, K., Ramsden, D., Wu, G., and Guidos, C.J. (1995). In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J Immunol* 154, 5011-5022.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106, 1127-1137.
- Guicciardi, M.E., Leist, M., and Gores, G.J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881-2890.
- Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2001). Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol* 159, 2045-2054.
- Gulow, K., Kaminski, M., Darvas, K., Suss, D., Li-Weber, M., and Krammer, P.H. (2005). HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J Immunol* 174, 5249-5260.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., et al. (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor escape. *Science* 274, 1363-1366.
- Hao, Z., Duncan, G.S., Chang, C.C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., et al. (2005). Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121, 579-591.
- Hara, H., Takeda, A., Takeuchi, M., Wakeham, A.C., Itie, A., Sasaki, M., Mak, T.W., Yoshimura,

- A., Nomoto, K., and Yoshida, H. (2002). The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes. *J Immunol* 168, 2288-2295.
- Harris, A.S., and Morrow, J.S. (1990). Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3009-3013.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., *et al.* (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Henry-Mowatt, J., Dive, C., Martinou, J.C., and James, D. (2004). Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23, 2850-2860.
- Hernandez-Munain, C., Sleckman, B.P., and Krangel, M.S. (1999). A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR alpha enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* 10, 723-733.
- Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 14, 354-359.
- Hishita, T., Tada-Oikawa, S., Tohyama, K., Miura, Y., Nishihara, T., Tohyama, Y., Yoshida, Y., Uchiyama, T., and Kawanishi, S. (2001). Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 61, 2878-2884.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5, 772-782.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.
- Horak, I. (1995). Immunodeficiency in IL-2-knockout mice. *Clin Immunol Immunopathol* 3, 172-173.
- Houseweart, M.K., Vilaythong, A., Yin, X.M., Turk, B., Noebels, J.L., and Myers, R.M. (2003). Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Cell Death Differ* 10, 1329-1335.
- Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., and Von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533-540.
- Hugo, P., Boyd, R.L., Waanders, G.A., and Scollay, R. (1991). CD4+CD8+CD3high thymocytes appear transiently during ontogeny: evidence from phenotypic and functional studies. *Eur J Immunol* 21, 2655-2660.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Izquierdo, M., Grandien, A., Criado, L.M., Robles, S., Leonardo, E., Albar, J.P., de Buitrago, G.G., and Martinez, A.C. (1999). Blocked negative selection of developing T cells in mice expressing the baculovirus p35 caspase inhibitor. *EMBO J* 18, 156-166.
- Jaattela, M., and Tschopp, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4, 416-423.
- Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.
- Johnson, D.E. (2000). Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 14, 1695-1703.
- June, C.H., Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1987). T-cell

- proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7, 4472-4481.
- Kagedal, K., Johansson, U., and Ollinger, K. (2001a). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 15, 1592-1594.
- Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I., and Brunk, U.T. (2001b). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* 359, 335-343.
- Kappler, J.W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.
- Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (1998). Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 143, 1353-1360.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., and Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182, 1777-1783.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kishimoto, H., and Sprent, J. (1999). Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* 190, 65-73.
- Kisielow, P., Teh, H.S., Bluthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733.
- Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., and Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kos, J., and Lah, T.T. (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 5, 1349-1361.
- Kotzin, B.L., Babcock, S.K., and Herron, L.R. (1988). Deletion of potentially self-reactive T cell receptor specificities in L3T4-, Lyt-2- T cells of lpr mice. *J Exp Med* 168, 2221-2229.
- Kovalik, J.P., Ansari, B., and Boothby, M. (1996). Rapid commitment to negative selection of a thymocyte line independent of CD4 co-engagement. *J Immunol* 157, 5290-5299.
- Krammer, P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krammer, P.H., Arnold, R., and Lavrik, I.N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-542.
- Krammer, P.H., Citronbaum, R., Read, S.E., Forni, L., and Lang, R. (1976). Murine thymic lymphomas as model tumors for T-cell studies. T-cell markers, immunoglobulin and Fc-receptors on AKR thymomas. *Cell Immunol* 21, 97-111.
- Krammer, P.H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P.T., Knipping, E., Westendorp, M.O., et al. (1994). The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* 142, 175-191.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kroemer, G., and Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5, 886-897.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24, 571-606.
- Lamhamedi-Cherradi, S.E., Zheng, S.J., Maguschak, K.A., Peschon, J., and Chen, Y.H. (2003). Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 4, 255-260.

- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14, 44-55.
- Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., and Glimcher, L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Lee, S.L., Wesselschmidt, R.L., Linette, G.P., Kanagawa, O., Russell, J.H., and Milbrandt, J. (1995). Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 269, 532-535.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001a). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001b). Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8, 324-326.
- Leithauser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Moller, P. (1993). Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69, 415-429.
- Lerner, A., Clayton, L.K., Mizoguchi, E., Ghendler, Y., van Ewijk, W., Koyasu, S., Bhan, A.K., and Reinherz, E.L. (1996). Cross-linking of T-cell receptors on double-positive thymocytes induces a cytokine-mediated stromal activation process linked to cell death. *EMBO J* 15, 5876-5887.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., and Cook, S.J. (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278, 18811-18816.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Liu, C.P., Crawford, F., Marrack, P., and Kappler, J. (1998). T cell positive selection by a high density, low affinity ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4522-4526.
- Liu, N., Raja, S.M., Zazzeroni, F., Metkar, S.S., Shah, R., Zhang, M., Wang, Y., Bromme, D., Russin, W.A., Lee, J.C., et al. (2003). NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *EMBO J* 22, 5313-5322.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2002). Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14, 727-733.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loeffler, M., and Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256, 19-26.
- Lopez-Hernandez, F.J., Ortiz, M.A., Bayon, Y., and Piedrafita, F.J. (2003). Z-FA-fmk inhibits effector caspases but not initiator caspases 8 and 10, and demonstrates that novel anticancer retinoid-related molecules induce apoptosis via the intrinsic pathway. *Mol Cancer Ther* 2, 255-263.
- Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction:

lessons from knockout mice. *Immunity* 10, 629-639.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Lüthi, A.U., and Martin, S.J. (2007). The CASHBA: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650.

Mariani, S.M., Matiba, B., Baumler, C., and Krammer, P.H. (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* 25, 2303-2307.

Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A.M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Ohashi, P.S. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* 167, 4966-4973.

Markert, M.L., Boeck, A., Hale, L.P., Kloster, A.L., McLaughlin, T.M., Batchvarova, M.N., Douek, D.C., Koup, R.A., Kostyu, D.D., Ward, F.E., *et al.* (1999). Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med* 341, 1180-1189.

Marsden, V.S., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P.G., Huang, D.C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K.J., *et al.* (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419, 634-637.

Martin, S., and Bevan, M.J. (1997). Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. *Eur J Immunol* 27, 2726-2736.

Martinez-Lorenzo, M.J., Alava, M.A., Gamen, S., Kim, K.J., Chuntharapai, A., Pineiro, A., Naval, J., and Anel, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* 28, 2714-2725.

Martins, L.M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N.F., Lemoine, N.R., Savopoulos, J., Gray, C.W., Creasy, C.L., Dingwall, C., *et al.* (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277, 439-444.

Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G.P., *et al.* (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 24, 9848-9862.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., *et al.* (1998a). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187, 1261-1271.

Mathis, D., and Benoist, C. (2007). A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol* 8, 645-650.

McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S., and Evan, G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215-227.

McCarty, N., Paust, S., Ikizawa, K., Dan, I., Li, X., and Cantor, H. (2005). Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* 6, 65-72.

McKeithan, T.W. (1995). Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5042-5046.

Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.

Mihalik, R., Imre, G., Petak, I., Szende, B., and Kopper, L. (2004). Cathepsin B-independent abrogation of cell death by CA-074-OMe upstream of lysosomal breakdown. *Cell Death Differ* 11, 1357-1360.

Miller, J.F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet* 2, 748-749.

Misra, R.S., Jelley-Gibbs, D.M., Russell, J.Q., Huston, G., Swain, S.L., and Budd, R.C. (2005). Effector CD4+ T cells generate intermediate caspase activity and cleavage of caspase-8 substrates. *J Immunol* 174, 3999-4009.

- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J., and Grutter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem* 272, 6539-6547.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-272.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-775.
- Montaser, M., Lalmanach, G., and Mach, L. (2002). CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol Chem* 383, 1305-1308.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.
- Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., and Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. *FEBS Lett* 280, 307-310.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nagata, S., and Suda, T. (1995). Fas und Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1, 39-43.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
- Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R., *et al.* (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10, 207-217.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F.W., *et al.* (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 261, 1584-1588.
- Nakayama, T., June, C.H., Munitz, T.I., Sheard, M., McCarthy, S.A., Sharrow, S.O., Samelson, L.E., and Singer, A. (1990). Inhibition of T cell receptor expression and function in immature CD4+CD8+ cells by CD4. *Science* 249, 1558-1561.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-490.
- Newton, K., Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, K.G., and Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J* 17, 706-718.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nishida, T., Matsuki, Y., Ono, T., Oguma, T., Tsujimoto, K., Sato, M., and Tadakuma, T. (2004). The novel murine CD4+CD8+ thymocyte cell line exhibits lineage commitment into both CD4+ and CD8+ T cells by altering the intensity and the duration of anti-CD3 stimulation in vitro. *J Immunol* 172, 6634-6641.
- Nishimura, Y. (1988). [Intracellular processing and activation of lysosomal cathepsins]. *Seikagaku* 60, 1271-1278.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S.,

- Dhein, J., Trauth, B.C., *et al.* (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267, 10709-10715.
- Ohashi, P.S., Pircher, H., Burki, K., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1990). Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 346, 861-863.
- Okada, H., and Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4, 592-603.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-676.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922.
- Page, D.M., Kane, L.P., Allison, J.P., and Hedrick, S.M. (1993). Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* 151, 1868-1880.
- Page, D.M., Roberts, E.M., Peschon, J.J., and Hedrick, S.M. (1998). TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J Immunol* 160, 120-133.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3, 383-391.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412, 90-94.
- Perfettini, J.L., Roumier, T., and Kroemer, G. (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15, 179-183.
- Persson, H.L., Yu, Z., Tirosh, O., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2003). Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med* 34, 1295-1305.
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1955-1960.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F.C., and Krammer, P.H. (1998). The Death Receptors. In *Apoptosis : biology and mechanisms*, S. Kumar, ed. (Berlin New York, Springer), pp. 25-63.
- Petit, P.X., Lecoecur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., and Gougeon, M.L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130, 157-167.
- Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 396, 7-13.
- Petrie, H.T., Hugo, P., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J Exp Med* 172, 1583-1588.
- Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Kontgen, F., Adams, J.M., *et al.* (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12424-12431.
- Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 179, 709-713.
- Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., and Shi, Y. (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-557.
- Ramsey, C., Bukrinsky, A., and Peltonen, L. (2002a). Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum Mol Genet* 11, 3299-3308.
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-

- Huikko, M., and Peltonen, L. (2002b). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11, 397-409.
- Reichmann, E. (2002). The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol* 12, 309-315.
- Richie, E.R., McEntire, B., Crispe, N., Kimura, J., Lanier, L.L., and Allison, J.P. (1988). α/β antigen receptor gene and protein expression occurs at early stage of thymocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1174-1178.
- Roberg, K., Johansson, U., and Ollinger, K. (1999). Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27, 1228-1237.
- Roberg, K., Kagedal, K., and Ollinger, K. (2002). Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol* 161, 89-96.
- Roberg, K., and Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol* 152, 1151-1156.
- Roberts, L.R., Kurosawa, H., Bronk, S.F., Fesmier, P.J., Agellon, L.B., Leung, W.Y., Mao, F., and Gores, G.J. (1997). Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 113, 1714-1726.
- Rodewald, H.R., and Fehling, H.J. (1998). Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol* 69, 1-112.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V.A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., *et al.* (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 14, 2075-2086.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., *et al.* (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-625.
- Rowan, A.D., Mason, P., Mach, L., and Mort, J.S. (1992). Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 267, 15993-15999.
- Rozman, J., Stojan, J., Kuhelj, R., Turk, V., and Turk, B. (1999). Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* 459, 358-362.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tamlyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., *et al.* (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.
- Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., and Orrenius, S. (1999). Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6, 495-496.
- Sandalova, E., Wei, C.H., Masucci, M.G., and Levitsky, V. (2004). Regulation of expression of Bcl-2 protein family member Bim by T cell receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3011-3016.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131-136.
- Schmitz, I., Meyer, C., and Schulze-Osthoff, K. (2006). CD95 ligand mediates T-cell receptor-induced apoptosis of a CD4⁺ CD8⁺ double positive thymic lymphoma. *Oncogene* 25, 7587-7596.
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (1999). Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* 442, 117-121.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.

- Sebzda, E., Wallace, V.A., Mayer, J., Yeung, R.S., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1994). Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 263, 1615-1618.
- Sen-Majumdar, A., Guidos, C., Kina, T., Lieberman, M., and Weissman, I.L. (1994). Characterization of preneoplastic thymocytes and of their neoplastic progression in irradiated C57BL/Ka mice. *J Immunol* 153, 1581-1592.
- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H., and Loh, D.Y. (1988). Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336, 73-76.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., *et al.* (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197-206.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Smith, K.G., Strasser, A., and Vaux, D.L. (1996). CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J* 15, 5167-5176.
- Smith, R.A., Copp, L.J., Donnelly, S.L., Spencer, R.W., and Krantz, A. (1988). Inhibition of cathepsin B by peptidyl aldehydes and ketones: slow-binding behavior of a trifluoromethyl ketone. *Biochemistry* 27, 6568-6573.
- Sommers, C.L., Lee, J., Steiner, K.L., Gurson, J.M., Depersis, C.L., El-Khoury, D., Fuller, C.L., Shores, E.W., Love, P.E., and Samelson, L.E. (2005). Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection. *J Exp Med* 201, 1125-1134.
- Sprent, J., and Kishimoto, H. (2001). The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 609-616.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Stegh, A.H., Herrmann, H., Lampel, S., Weisenberger, D., Andra, K., Seper, M., Wiche, G., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 5665-5679.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., *et al.* (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276, 3149-3157.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., and Galle, P.R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2, 1361-1366.
- Stranges, P.B., Watson, J., Cooper, C.J., Choisy-Rossi, C.M., Stonebraker, A.C., Beighton, R.A., Hartig, H., Sundberg, J.P., Servick, S., Kaufmann, G., *et al.* (2007). Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26, 629-641.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Strasser, A., and Pellegrini, M. (2004). T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* 25, 610-615.
- Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D.C., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Cullen, L., Cory, S., and Adams, J.M. (2000). The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* 917, 541-548.
- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., and Lenardo, M. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307, 1465-1468.

- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9, 565-574.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 186, 25-37.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.
- Sytwu, H.K., Liblau, R.S., and McDevitt, H.O. (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 5, 17-30.
- Takahama, Y., and Nakauchi, H. (1996). Phorbol ester and calcium ionophore can replace TCR signals that induce positive selection of CD4 T cells. *J Immunol* 157, 1508-1513.
- Takahama, Y., Shores, E.W., and Singer, A. (1992). Negative selection of precursor thymocytes before their differentiation into CD4+CD8+ cells. *Science* 258, 653-656.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E., and Herman, B. (2004). Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 62, 497-504.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., and Nagata, S. (1994a). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969-976.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T., and Nagata, S. (1994b). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 6, 1567-1574.
- Tanahashi, M., Yokoyama, T., Kobayashi, Y., Yamakawa, Y., Maeda, M., and Fujii, Y. (2001). Effect of phorbol ester and calcium ionophore on human thymocytes. *Hum Immunol* 62, 771-781.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., and Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4, 31-36.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Zhao, J.J., Howard, A.D., Griffin, P.R., and Chapman, K.T. (1994). Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry* 33, 3934-3940.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.
- Tobin, D.J., Foitzik, K., Reinheckel, T., Mecklenburg, L., Botchkarev, V.A., Peters, C., and Paus, R. (2002). The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 160, 1807-1821.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.

- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., and Bieth, J.G. (1993). Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* 32, 375-380.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477, 98-111.
- Turk, D., Podobnik, M., Popovic, T., Katunuma, N., Bode, W., Huber, R., and Turk, V. (1995). Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry* 34, 4791-4797.
- Turk, V., and Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285, 213-219.
- Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 20, 4629-4633.
- van der Stappen, J.W., Paraskeva, C., Williams, A.C., Hague, A., and Maciewicz, R.A. (1991). Relationship between the secretion of cysteine proteinases and their inhibitors and malignant potential. *Biochem Soc Trans* 19, 362S.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenabeele, P. (2002a). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031-1042.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002b). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20-26.
- Van Noorden, C.J. (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 103, 241-251.
- Vancompernelle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G., Van de Craen, M., De Vos, K., Totty, N., Sterling, A., Fiers, W., Vandenabeele, P., and Grooten, J. (1998). Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* 438, 150-158.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Vaux, D.L., and Flavell, R.A. (2000). Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12, 719-724.
- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Veis, D.J., Sentman, C.L., Bach, E.A., and Korsmeyer, S.J. (1993a). Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 151, 2546-2554.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993b). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187, 1477-1485.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) (Solothurn).
- von Boehmer, H. (1988). The developmental biology of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 6, 309-326.
- von Boehmer, H., and Fehling, H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15, 433-452.
- Vonarbourg, C., Stolzenberg, M.C., Holzelova, E., Fischer, A., Deist, F.L., and Rieux-Laucat, F. (2002). Differential sensitivity of Jurkat and

- primary T cells to caspase-independent cell death triggered upon Fas stimulation. *Eur J Immunol* 32, 2376-2384.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., *et al.* (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78, 343-352.
- Walsh, C.M., Wen, B.G., Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Dixit, V.M., and Hedrick, S.M. (1998). A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* 8, 439-449.
- Wang, D., Muller, N., McPherson, K.G., and Reichardt, H.M. (2006). Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 176, 1695-1702.
- Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20-26.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992a). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992b). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148, 1274-1279.
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Heinrichson, R.L., Tomasselli, A.G., and Watenpaugh, K.D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* 7, 1135-1143.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Welss, T., Sun, J., Irving, J.A., Blum, R., Smith, A.I., Whisstock, J.C., Pike, R.N., von Mikecz, A., Ruzicka, T., Bird, P.I., *et al.* (2003). Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* 42, 7381-7389.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., and Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299, 1859-1863.
- Werlen, G., Hausmann, B., and Palmer, E. (2000). A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406, 422-426.
- Werneburg, N., Guicciardi, M.E., Yin, X.M., and Gores, G.J. (2004). TNF-alpha-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G436-443.
- Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G947-956.
- White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W., and Marrack, P. (1989). The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56, 27-35.
- Williams, C.B., Engle, D.L., Kersh, G.J., Michael White, J., and Allen, P.M. (1999). A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J Exp Med* 189, 1531-1544.
- Williams, J.A., Sharrow, S.O., Adams, A.J., and Hodes, R.J. (2002). CD40 ligand functions non-cell autonomously to promote deletion of self-reactive thymocytes. *J Immunol* 168, 2759-2765.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., *et al.* (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370, 270-275.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.
- Wu, G.S., Saftig, P., Peters, C., and El-Deiry, W.S. (1998). Potential role for cathepsin D in

p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* 16, 2177-2183.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Xia, L., Kilb, J., Wex, H., Li, Z., Lipyansky, A., Breuil, V., Stein, L., Palmer, J.T., Dempster, D.W., and Bromme, D. (1999). Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol Chem* 380, 679-687.

Xiang, J., Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14559-14563.

Xiang, Z., Ahmed, A.A., Moller, C., Nakayama, K., Hatakeyama, S., and Nilsson, G. (2001). Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation. *J Exp Med* 194, 1561-1569.

Xue, D., and Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377, 248-251.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355-1357.

Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169, 1747-1756.

Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 274, 13733-13736.

Yuan, X.M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., and Brunk, U.T. (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6286-6291.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., and Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181, 1661-1672.

Zdolsek, J., Zhang, H., Roberg, K., and Brunk, U. (1993). H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells. *Free Radic Res Commun* 18, 71-85.

Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2003). Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* 270, 3778-3786.

Zhao, M., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2000). Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2? *FEBS Lett* 485, 104-108.

Zhao, M., Eaton, J.W., and Brunk, U.T. (2001). Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett* 509, 405-412.

Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., and Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.

Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J.D. (1996). Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J Exp Med* 183, 1879-1892.

Ziegler, S.F. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24, 209-226.

Zimmermann, C., Rawiel, M., Blaser, C., Kaufmann, M., and Pircher, H. (1996). Homeostatic regulation of CD8⁺ T cells after antigen challenge in the absence of Fas (CD95). *Eur J Immunol* 26, 2903-2910.

Zola, H., Swart, B., Nicholson, I., Aasted, B., Bensussan, A., Boumsell, L., Buckley, C., Clark, G., Drbal, K., Engel, P., *et al.* (2005). CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 106, 3123-3126.

Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15, 1481-1486.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAD	engl.: <i>activated T-cell autonomous death</i>
AFC	7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AICD	engl.: <i>activation induced cell death</i>
AIF	engl.: <i>apoptosis inducing factor</i>
AIRE	engl.: <i>autoimmune regulator</i>
Ak	Antikörper
ANT	Adeninnukleotid-Translokator
APC	engl.: <i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	engl.: <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	engl.: <i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	engl.: <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	engl.: <i>B-cell-lymphoma 10</i>
BH	engl.: <i>Bcl-2 homology</i>
Bid	engl.: <i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bim	engl.: <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
Bik	engl.: <i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bmf	engl.: <i>Bcl-2-modifying factor</i>
Bok	engl.: <i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BOO	engl.: <i>Bcl-2 homologue of ovary</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAD	engl.: <i>caspase-activated DNase</i>
CARD	engl.: <i>caspase activation and recruitment domain</i>
CatB	Cathepsin B
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>

cDNA	komplementäre DNA
c-FLIP	engl.: <i>cellular FLICE-inhibitory protein</i>
c-IAP	engl.: <i>cellular IAP</i>
CrmA	engl.: <i>cytokine response modifier</i>
cTEC	engl.: <i>cortical thymic epithelial cells</i>
Ctr	Kontrolle
d	Tag
Da	Dalton
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIABLO	engl.: <i>direct IAP-binding protein with low pH</i>
DISC	engl.: <i>death inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt-positiv
DTT	Dithiotreitol
ECL	engl.: <i>enhanced chemoluminescence</i>
engl.:	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	engl.: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FADD	engl.: <i>Fas-associated death domain protein</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	engl.: FADD-like ICE
Foxp3	engl.: <i>Forkhead-Box P3</i>
FSC	engl.: <i>forward scatter</i>
FTOK	fötale Thymusorgankulturen
g	Gramm
GRB2	engl.: <i>growth receptor binding protein</i>
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

Hrk	engl.: <i>hara-kiri</i>
HRPO	Meerettich Peroxidase
HtrA2	engl.: <i>high temperature requirement protein A2</i>
IAP	engl.: <i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
ICAD	engl.: <i>inhibitor of CAD</i>
ICE	engl.: <i>Interleukin-1β converting enzym</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Iono	Ionomyzin
IP	Immunopräzipitation
JNK	engl.: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-terathylbenz-imidazolylcarbocyaniniodid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAMP	engl.: <i>lysosom-associated membrane protein</i>
LAT	engl.: <i>linker of activated T-cells</i>
LMP	lysosomale Membranpermeabilisierung
LZ	Leuzin-Zipper
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
MDa	Megadalton
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MOMP	engl.: <i>mitochondrial outer membrane permiabilisation</i>
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
mTEC	engl.: <i>medullary thymic epithelial cell</i>
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
μ mol	Mikromol
Nac	N-Acetyl-Cystein
ng	Nanogramm
NGF	engl.: <i>nerve growth factor</i>

nm	Nanometer
NOXA	engl.: <i>NADPH oxidase activator</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	Phosphatidylserin
PT	Permeabilitätstransition
PUMA	engl.: <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RIP	engl.: <i>receptor interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
SLP-76	engl.: <i>SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa</i>
SMAC	engl.: <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SP	engl.: <i>single positive</i>
SSC	engl.: <i>side scatter</i>
tBid	engl.: <i>truncated Bid</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAIL	engl.: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TZR	T-Zellrezeptor
U	engl.: <i>unit</i>
VDAC	engl.: <i>voltage-dependent anion channel</i>
WB	Western Blot
XIAP	engl.: <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Weitere Abkürzungen sind in den einzelnen Kapiteln erläutert.

7 **Veröffentlichungen**

Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C.R., and Krammer, P.H. (2006). How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36, 1654-1658.

Brenner, D., Golks, A., Becker, M., Müller, W., Frey, C.R., Novak, R., Melamed, D., Kiefer, F., Krammer, P.H., and Arnold, R. (2007). Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood* 110, 3968-3977.

8 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die Literatur, deren Ergebnisse in die Dissertation eingeflossen sind, ist vollständig angegeben. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, im Februar 2008

.....

Mareike Becker